

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude des interactions entre HIF-1, p53 et la caséine kinase 2

Hubert, Antoine

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Etude des interactions entre HIF-1, p53 et la Caséine Kinase 2

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Antoine HUBERT

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude des interactions entre HIF-1, p53 et la Caséine Kinase 2

HUBERT Antoine

Résumé

L'étude des mécanismes conduisant au développement des tumeurs a mis en évidence trois acteurs impliqués dans la croissance de celles-ci, HIF-1, p53 et CK2. Dans de nombreux cancers (plus de 50%), la survie des cellules tumorales dépend de la mutation de p53. Dans d'autres types de cancers, on assiste à la surexpression de la CK2. Finalement, HIF-1 est activé dans la plupart des tumeurs, ce qui initie la néoangiogenèse. Tous ces processus ont pour fonction d'assurer la survie des cellules tumorales. Des interactions existent entre ces différentes protéines : p53 inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1, tandis que la CK2 diminue la stabilité de p53. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié les interactions entre CK2 et HIF-1.

Nous avons ainsi montré que l'inhibition de la CK2 induit une augmentation de la quantité et de l'activité de p53, et ce en parallèle avec une diminution de l'activité de HIF-1 observée sans changement de la quantité de HIF-1 α . Il semble que la diminution de l'activité de HIF-1 se fasse via une augmentation de p53, parce qu'en surexprimant p53, l'activité de HIF-1 diminue et lorsque p53 est absent, on ne remarque plus d'effet des inhibiteurs de la CK2. Nous avons finalement démontré une interaction directe entre HIF-1 et p53 par coimmunoprécipitation. De plus, la quantité de HIF-1 fixé à p53 augmente lorsque la quantité de cette protéine augmente suite à l'inhibition de la CK2.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère que l'inhibition de p53 par la CK2 permettrait l'activation de HIF-1 en hypoxie, par levée de l'inhibition exercée sur ce facteur de transcription par p53.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: C. Michiels

Voici venue la fin de ces quatre années d'études et il est temps de remercier ceux qui ont contribué au bon déroulement de ce travail.

Je veux tout d'abord remercier Monsieur le Professeur José Remacle pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je désire ensuite remercier du fond du cœur ma promotrice, Madame Carine Michiels, pour ses encouragements, sa disponibilité, ses conseils et sa compréhension à mon égard lors de mon apprentissage.

Je désire ensuite remercier Monsieur Sébastien Pyrdit Ruys pour sa disponibilité et pour ses conseils, ainsi que tout le reste de l'équipe HIF pour son accueil et pour ses recommandations lors des nombreuses réunions.

Merci aussi aux confocaleuses Mesdames Noëlle Ninane et Catherine Demazy pour leur aide dévouée concernant les immunofluorescences.

Un grand merci à Edouard Delaive pour ses conseils au sujet des westerns blot.

Je veux également remercier Mademoiselle Valérie Migeot pour sa disponibilité lors des trans-AM.

Enfin, je désire faire un clin d'oeil à tous les autres mémorants, en particulier ceux d'URBC, pour l'ambiance de travail et pour l'aide apportée en cas de problèmes.

Table des matières

Table des matières	1
Introduction	4
1. Hypoxie	4
1.1 Introduction	4
1.2 Régulation du métabolisme cellulaire	4
2. HIF-1	6
2.1 Introduction	6
2.2 Description	6
2.3 Gènes-cibles	7
2.3.1 Mécanismes de régulation dépendants de l'oxygène	7
2.3.2 Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1	8
2.3.3. CBP/p ₃₀₀	8
2.3.4 Mécanismes de régulation de la synthèse de HIF-1 α indépendants de l'oxygène	9
2.3.5 Rôle des kinases dans l'activation de HIF en hypoxie	9
3. CK2	11
3.1 Description	11
3.1.1 La sous-unité catalytique CK2 α	11
3.1.2 La sous-unité régulatrice CK2 β	11
3.2 Cinétique et localisation cellulaire	11
3.3 Fonctions	12
3.3.1 La CK2 favorise la survie cellulaire	12
3.3.2 La CK2 est un anti-apoptotique	13
3.4 Régulations	13
3.4.1 Exemples de dérégulations : les cancers	14
4. p53	15
4.1 Introduction	15
4.2 Structure	15
4.2.1 Domaine transactivateur	15
4.2.2 Domaine de liaison à l'ADN séquence-spécifique	15
4.2.3 Domaine de liaison non-spécifique à l'ADN et d'oligomérisation	16
4.3 Régulation et modulation de la fonction de p53	16
4.3.1 Fonctions générales de contrôle de p53	16
4.3.2 Mécanismes d'activation de p53	17
4.3.3 Conclusion	18
5. Résumé des interactions entre les différentes protéines étudiées	19
5.1 Interactions entre p53 et CK2	19
5.2 Interactions entre HIF et p53	20
Objectifs du mémoire	21
Matériel et Méthodes	22
1. Culture cellulaire	22
1.1 Lignées cellulaires	22
1.2 Matériel	22
1.2.1 Supports	22
1.2.2 Milieux	22
1.2.3 Méthode	22
2. Incubation en hypoxie	23
2.1 Matériel	23
2.1.1 Milieu	23

2.1.2 Inhibiteurs	23
2.2 Méthode	23
3. Transfection	23
3.1 Matériel.....	23
3.2 Méthode	24
4. Système rapporteur	24
4.1 Principe de la méthode	24
4.2 Méthode	24
5. Immunofluorescence	24
5.1 Principe de la méthode	24
5.2 Matériel.....	25
5.2.1 Supports	25
5.2.2 Solutions	25
5.2.3 Anticorps et marqueur nucléaire.....	25
5.3 Méthode	25
6. Western Blot.....	26
6.1 Lysat cellulaire total	26
6.1.1 Matériel.....	26
6.1.2 Méthode	26
6.2 Méthode de Bradford.....	26
6.2.1 But de la méthode	26
6.2.2 Matériel.....	26
6.2.3 Méthode	27
6.3 Electrophorèse et révélation	27
6.3.1 Matériel.....	27
6.3.2 Supports	27
6.3.3 Anticorps	27
6.3.4 Méthodes	28
7. Coimmunoprécipitation	29
7.1 But de la méthode	29
7.2 Matériel.....	29
7.3 Méthodes	29
8. Extraction nucléaire	30
8.1 But	30
8.2 Matériel.....	30
8.3 Méthodes	30
9. Trans-AM	31
9.1 But et principe de la méthode	31
9.2 Matériel.....	31
9.3 Méthode	31
10. Extraction d'ARN total.....	32
10.1 Matériel.....	32
10.2 Méthode	32
11. Reverse transcription	33
11.1 Objectif de la méthode.....	33
11.2 Matériel.....	33
11.3 Méthode	33
Real-time PCR	33
12.1 Principe.....	33
12.2 Matériel.....	34

12.3 Méthode	34
12.4 Analyse des résultats	34
Résultats	36
Première partie : Etude de l'influence des inhibiteurs de la CK2 sur l'activité de HIF-1 et de p53.....	36
1.1 Effets sur la quantité de protéines.....	36
1.1.1 Western blots	36
1.1.2 Conclusions	38
1.2 Effets sur la liaison à l'ADN de HIF-1 α et de p53.....	38
1.2.1 Effet des inhibiteurs sur la liaison de HIF-1 à sa séquence consensus (Figure 6).....	39
1.2.2 Effet des inhibiteurs sur la liaison de p53 à sa séquence consensus.....	39
1.2.3 Conclusions	39
1.3 Effets sur l'activité transcriptionnelle	39
1.3.1 Systèmes rapporteurs.....	39
1.3.2 Gènes cibles de HIF-1 α et de p53	40
1.4 Discussion des résultats	41
Deuxième partie : Etude des interactions entre HIF-1α et p53.....	41
2.1 Surexpression de p53.....	42
2.2 Etude de l'activité de HIF-1 dans des cellules Hep3B	42
2.2.1 Système rapporteur	42
2.2.2 Gène cible de HIF-1	42
2.3 Effets de la pifithrine sur la quantité et l'activité de HIF-1	43
2.3.1 Effets de la pifithrine sur la quantité de HIF-1 α et de p53.....	43
2.3.2 Effets sur l'activité de HIF-1 et de p53	44
2.3.3 Conclusions	44
2.4 Interaction directe entre HIF et p53.....	45
2.4.1 Mise en évidence de l'interaction par trans-AM modifié.....	45
2.4.2 Mise en évidence de l'interaction entre p53 et HIF-1 α par coimmunoprécipitation	47
2.4.3 Interprétation des résultats.....	48
Conclusions et perspectives	49
Bibliographie.....	53

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
4E-BPI	4E binding protein I
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine biphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
b-HLH	Basic-Helix-Loop-Helix
BSA	Bovine Serum Albumin
CBP	CREB binding protein
cdk	Cyclin-dependent kinase
Chk-1	Human checkup kinase
CK2	Caséine kinase 2
CO₂	Dioxyde de carbone
CREB	cAMP-Response Element Binding protein
CSN	Cop9 signalosome
Ct	Cycle threshold
C-TAD	transactivation domain C-terminal
DHG	DMEM High glucose
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide Triphosphate
DRB	5, 6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced Chemo Luminescent
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
eIF-4E	Eukaryotic initiation factor-4E
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
FT	Facteur de transcription
H	Helix
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HLH	Helix-Loop-Helix
HPH	HIF-1 prolyl hydroxylase
HRE	Hypoxia-responsive element
ICAD	Inhibitor of CAD
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
Kb	Kilo base
L	Loop
LSH	Loop-Sheet-Helix
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2	Murine double minute 2
MEK	Map/ERK kinase

MES	N-morphino ethane sulfonic acid
MOPS	Acide 3-morpholino-propanesulfonique
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NLS	Nuclear Localisation Sequence
N-TAD	Transactivation Domain N-Terminal
ODD	Oxygen Dependent Degradation domain
PAS	Per Ahr/ARNT Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PH	Prolyl hydroxylase
PI₃K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIB	Phosphatases inhibitor buffer
PIC	Proteases inhibitor cocktail
PKCγ	Protéine kinase C γ
PLB	Passive Lysis Buffer
PNPP	Phospho-Nitrophenyl Phosphate
PTEN	Phosphatase tensine homologue
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
pVHL	protéine Von Hippel Lindau
rpm	Rotations par minute
TAFs	TATA associated Factors
TBP	TATA binding protein
TBS	Tris buffer saline
TBST	TBS + Tween
TFIID	Transcription factor IID
TRIS	Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
Tween	Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction

The diagram illustrates the mitochondrial electron transport chain (ETC) embedded in the inner mitochondrial membrane. The chain consists of several complexes and mobile carriers that transfer electrons from NADH and succinate to oxygen, which is reduced to water. Protons are pumped across the membrane by Complexes I, III, and IV, creating a proton gradient used for ATP synthesis.

Complex I: NADH dehydrogenase (1653 amino acids). It transfers electrons from NADH to FMN and then through a series of Fe-S clusters and heme b groups (bL, bH, bL, bH) to ubiquinone (UQ), which is reduced to ubiquinol (UQH₂). Four protons are pumped across the membrane.

Complex II: Succinate dehydrogenase (1399 and 1351 amino acids). It transfers electrons from succinate to FMN and then through heme b groups (bL, bH, bL, bH) to ubiquinone (UQ), which is reduced to ubiquinol (UQH₂). No protons are pumped.

Complex III: Cytochrome bc₁ complex (11022 amino acids). It transfers electrons from ubiquinol (UQH₂) to heme b groups (bL, bH, bL, bH) and then to cytochromes b_L, b_H, and c₁. Two protons are pumped across the membrane.

Complex IV: Cytochrome c oxidase (1931 amino acids). It transfers electrons from cytochrome c (reduced) to heme c groups (c₁, c₂) and then to cytochromes c₁ and c₂. Two protons are pumped across the membrane.

Complex V: ATP synthase (36134 and 36136 amino acids). It uses the proton gradient to drive the synthesis of ATP from ADP and P_i. No electrons are transferred.

Mobile Carriers: Ubiquinone (UQ) and ubiquinol (UQH₂) are mobile carriers that transfer electrons between Complexes I, II, and III. Cytochrome c (Cyt c) is a mobile carrier that transfers electrons between Complex III and Complex IV.

Legend:

- Complex I:** NADH dehydrogenase (1653 amino acids). Subunits: ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6, ND7, ND8, ND9, ND10, ND11, ND12, ND13, ND14, ND15, ND16, ND17, ND18, ND19, ND20, ND21, ND22, ND23, ND24, ND25, ND26, ND27, ND28, ND29, ND30, ND31, ND32, ND33, ND34, ND35, ND36, ND37, ND38, ND39, ND40, ND41, ND42, ND43, ND44, ND45, ND46, ND47, ND48, ND49, ND50, ND51, ND52, ND53, ND54, ND55, ND56, ND57, ND58, ND59, ND60, ND61, ND62, ND63, ND64, ND65, ND66, ND67, ND68, ND69, ND70, ND71, ND72, ND73, ND74, ND75, ND76, ND77, ND78, ND79, ND80, ND81, ND82, ND83, ND84, ND85, ND86, ND87, ND88, ND89, ND90, ND91, ND92, ND93, ND94, ND95, ND96, ND97, ND98, ND99, ND100, ND101, ND102, ND103, ND104, ND105, ND106, ND107, ND108, ND109, ND110, ND111, ND112, ND113, ND114, ND115, ND116, ND117, ND118, ND119, ND120, ND121, ND122, ND123, ND124, ND125, ND126, ND127, ND128, ND129, ND130, ND131, ND132, ND133, ND134, ND135, ND136, ND137, ND138, ND139, ND140, ND141, ND142, ND143, ND144, ND145, ND146, ND147, ND148, ND149, ND150, ND151, ND152, ND153, ND154, ND155, ND156, ND157, ND158, ND159, ND160, ND161, ND162, ND163, ND164, ND165, ND166, ND167, ND168, ND169, ND170, ND171, ND172, ND173, ND174, ND175, ND176, ND177, ND178, ND179, ND180, ND181, ND182, ND183, ND184, ND185, ND186, ND187, ND188, ND189, ND190, ND191, ND192, ND193, ND194, ND195, ND196, ND197, ND198, ND199, ND200, ND201, ND202, ND203, ND204, ND205, ND206, ND207, ND208, ND209, ND210, ND211, ND212, ND213, ND214, ND215, ND216, ND217, ND218, ND219, ND220, ND221, ND222, ND223, ND224, ND225, ND226, ND227, ND228, ND229, ND230, ND231, ND232, ND233, ND234, ND235, ND236, ND237, ND238, ND239, ND240, ND241, ND242, ND243, ND244, ND245, ND246, ND247, ND248, ND249, ND250, ND251, ND252, ND253, ND254, ND255, ND256, ND257, ND258, ND259, ND260, ND261, ND262, ND263, ND264, ND265, ND266, ND267, ND268, ND269, ND270, ND271, ND272, ND273, ND274, ND275, ND276, ND277, ND278, ND279, ND280, ND281, ND282, ND283, ND284, ND285, ND286, ND287, ND288, ND289, ND290, ND291, ND292, ND293, ND294, ND295, ND296, ND297, ND298, ND299, ND300, ND301, ND302, ND303, ND304, ND305, ND306, ND307, ND308, ND309, ND310, ND311, ND312, ND313, ND314, ND315, ND316, ND317, ND318, ND319, ND320, ND321, ND322, ND323, ND324, ND325, ND326, ND327, ND328, ND329, ND330, ND331, ND332, ND333, ND334, ND335, ND336, ND337, ND338, ND339, ND340, ND341, ND342, ND343, ND344, ND345, ND346, ND347, ND348, ND349, ND350, ND351, ND352, ND353, ND354, ND355, ND356, ND357, ND358, ND359, ND360, ND361, ND362, ND363, ND364, ND365, ND366, ND367, ND368, ND369, ND370, ND371, ND372, ND373, ND374, ND375, ND376, ND377, ND378, ND379, ND380, ND381, ND382, ND383, ND384, ND385, ND386, ND387, ND388, ND389, ND390, ND391, ND392, ND393, ND394, ND395, ND396, ND397, ND398, ND399, ND400, ND401, ND402, ND403, ND404, ND405, ND406, ND407, ND408, ND409, ND410, ND411, ND412, ND413, ND414, ND415, ND416, ND417, ND418, ND419, ND420, ND421, ND422, ND423, ND424, ND425, ND426, ND427, ND428, ND429, ND430, ND431, ND432, ND433, ND434, ND435, ND436, ND437, ND438, ND439, ND440, ND441, ND442, ND443, ND444, ND445, ND446, ND447, ND448, ND449, ND450, ND451, ND452, ND453, ND454, ND455, ND456, ND457, ND458, ND459, ND460, ND461, ND462, ND463, ND464, ND465, ND466, ND467, ND468, ND469, ND470, ND471, ND472, ND473, ND474, ND475, ND476, ND477, ND478, ND479, ND480, ND481, ND482, ND483, ND484, ND485, ND486, ND487, ND488, ND489, ND490, ND491, ND492, ND493, ND494, ND495, ND496, ND497, ND498, ND499, ND500, ND501, ND502, ND503, ND504, ND505, ND506, ND507, ND508, ND509, ND510, ND511, ND512, ND513, ND514, ND515, ND516, ND517, ND518, ND519, ND520, ND521, ND522, ND523, ND524, ND525, ND526, ND527, ND528, ND529, ND530, ND531, ND532, ND533, ND534, ND535, ND536, ND537, ND538, ND539, ND540, ND541, ND542, ND543, ND544, ND545, ND546, ND547, ND548, ND549, ND550, ND551, ND552, ND553, ND554, ND555, ND556, ND557, ND558, ND559, ND560, ND561, ND562, ND563, ND564, ND565, ND566, ND567, ND568, ND569, ND570, ND571, ND572, ND573, ND574, ND575, ND576, ND577, ND578, ND579, ND580, ND581, ND582, ND583, ND584, ND585, ND586, ND587, ND588, ND589, ND590, ND591, ND592, ND593, ND594, ND595, ND596, ND597, ND598, ND599, ND600, ND601, ND602, ND603, ND604, ND605, ND606, ND607, ND608, ND609, ND610, ND611, ND612, ND613, ND614, ND615, ND616, ND617, ND618, ND619, ND620, ND621, ND622, ND623, ND624, ND625, ND626, ND627, ND628, ND629, ND630, ND631, ND632, ND633, ND634, ND635, ND636, ND637, ND638, ND639, ND640, ND641, ND642, ND643, ND644, ND645, ND646, ND647, ND648, ND649, ND650, ND651, ND652, ND653, ND654, ND655, ND656, ND657, ND658, ND659, ND660, ND661, ND662, ND663, ND664, ND665, ND666, ND667, ND668, ND669, ND670, ND671, ND672, ND673, ND674, ND675, ND676, ND677, ND678, ND679, ND680, ND681, ND682, ND6

Fig. 1: Chaîne des transporteurs des électrons dans la membrane mitochondriale interne : (simulium.bio.uottawa.ca/.../Notes/Metabolisme.htm).

Introduction

1. Hypoxie

1.1 Introduction

L'hypoxie est un phénomène par lequel une entité pluricellulaire (un organe), ou unicellulaire se trouve en déprivation d'oxygène modérée. Elle diffère de l'anoxie par la concentration en oxygène : cette concentration est beaucoup plus faible en anoxie (<0,2%).

Ce phénomène est observé dans de nombreuses pathologies dans lesquelles la circulation sanguine est interrompue. Il induit des réponses cellulaires qui ont pour but à court terme d'assurer la survie des cellules et à plus long terme, de restaurer un apport en oxygène optimal. Au niveau des ischémies cardiaques, par exemple, lorsque la lumière d'une artère coronaire se rétrécit au cours de l'athérosclérose, un déficit en oxygène et en nutriments de plus en plus marqué s'instaure. Pour faire face à cette situation, le tissu situé en aval du rétrécissement coronaire induit une néoangiogenèse. Une situation similaire se présente lorsqu'une tumeur se développe dans un tissu. Au-delà d'une taille de 1mm^3 , le centre de la tumeur est en situation de déprivation d'oxygène. Cette tumeur est alors capable de produire des molécules qui induisent la néoangiogenèse, notamment parce que ces molécules possèdent un rôle de chémoattracteurs pour les vaisseaux en formation. Cette néoangiogenèse a pour but de rétablir un approvisionnement adéquat en oxygène.

1.2 Régulation du métabolisme cellulaire

Un des besoins cellulaires les plus fondamentaux est le maintien d'une concentration en ATP suffisante pour assurer les différentes fonctions cellulaires et l'homéostasie ionique, à l'aide de pompes ioniques dépendantes de l'ATP (Na^+/K^+ ATPases, par exemple).

La mort cellulaire survient lorsque la production d'ATP devient insuffisante pour couvrir les besoins énergétiques. Une diminution de la concentration intracellulaire en ATP entraîne un dysfonctionnement des pompes ioniques maintenant les différents gradients ioniques, provoquant des mouvements incontrôlés d'ions. L'ion Ca^{++} est un des ions qui génère le plus d'effets indésirables du fait de ses nombreuses implications dans le métabolisme cellulaire et par l'activation de phospholipases et protéases dépendantes du calcium qui vont induire la lyse de la cellule.

En état de normoxie, la cellule se sert de l'oxygène comme accepteur final des électrons dans la chaîne de transporteurs d'électrons située dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 1). Cette chaîne de transporteurs permet la transformation d'énergie proton motrice en ATP, par le biais d'une ATP-synthase, qui produit de l'ATP à partir d'ADP (Pugh *et al*, 2001). Les électrons passent par une série de complexes protéiques situés dans la membrane interne de la mitochondrie, pour aboutir à la réduction finale de l'oxygène en H_2O .

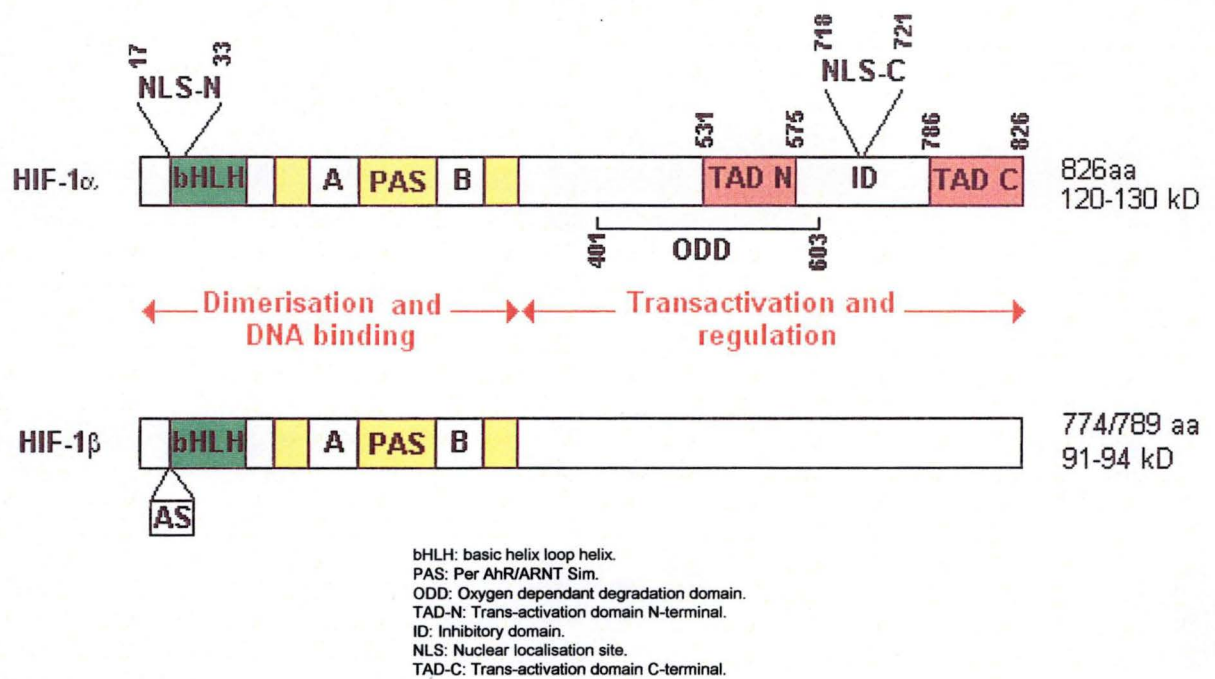


Fig. 2: Représentation schématique des domaines des deux sous-unités de HIF-1
 (<http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group7/cellularresponse.htm>)

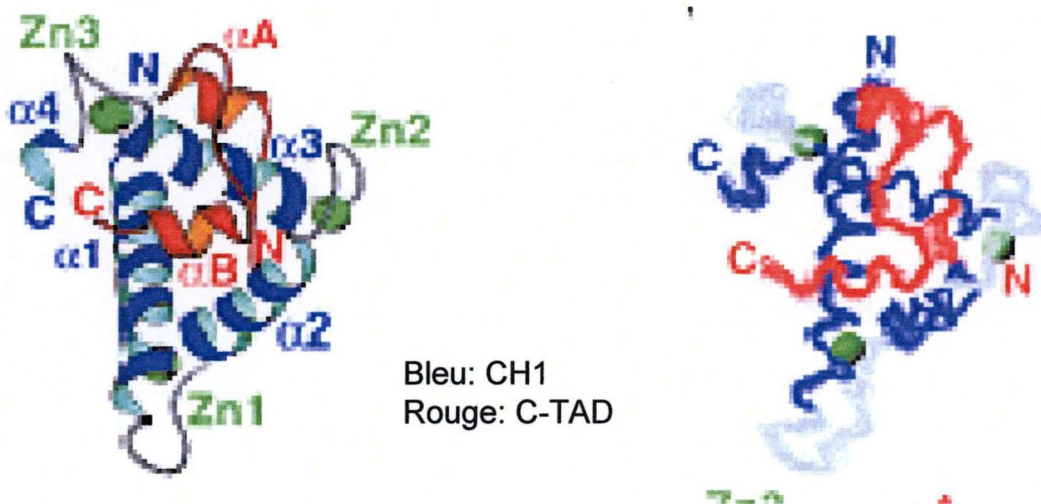


Fig. 3: Représentation des interactions entre le domaine de C-TAD de HIF-1α et l'hélice CH1 de p300
 (Freedman et al, 2003).

En hypoxie, l'oxygène se faisant rare, la cellule doit utiliser une voie alternative pour continuer à assurer une production suffisante d'ATP (Michiels, 2004). D'une part, la cellule va accroître ses processus de production d'énergie indépendants de l'oxygène, et d'autre part, elle va réduire sa consommation d'ATP. L'approvisionnement en énergie se fera à partir de voies métaboliques ne dépendant pas de l'oxygène, la voie des phosphorylations oxydatives étant inactivée : l'approvisionnement en ATP se fait principalement via la glycolyse. Bien que la glycolyse soit moins rentable au niveau de la production d'ATP que la respiration aérobie, elle a l'avantage de pouvoir fonctionner en l'absence d'oxygène. De plus, si la concentration en glucose autour de la cellule est suffisante, elle peut suffire au maintien d'une production d'ATP permettant la survie cellulaire. Cela se traduit à court terme par la régulation allostérique de l'activité phosphofructokinase et à plus long terme par la surexpression de nombreuses enzymes glycolytiques (Table 1) via l'activation du facteur de transcription HIF-1 (voir chapitre suivant). En ce qui concerne la réduction de la consommation d'ATP, la synthèse protéique, la synthèse d'ARN et d'ADN et le maintien de l'activité des pompes ioniques sont les processus qui consomment le plus d'ATP intra-cellulaire. En hypoxie, la distribution d'ATP se trouve rationnée et sera hiérarchisée (Buttgereit et Brand, 1995) selon les priorités pour la survie cellulaire. Ainsi, les synthèses nucléique et protéique sont largement inhibées, tandis que l'ATP est dirigé vers des voies métaboliques plus nécessaires à la survie cellulaire à court terme, comme le maintien des gradients ioniques (pompes Na^+/K^+ , pompes au Ca^{++}).

La sensibilité des cellules à l'hypoxie est très variable et semble être due à la balance de répartition de l'ATP entre les pompes ioniques et les autres processus de consommation de l'ATP. La consommation d'ATP par les pompes ioniques peut varier de 20% (hépatocytes, cellules musculaires) à 80 % (neurones). Les neurones seront donc plus sensibles à l'hypoxie que les deux autres types cellulaires.

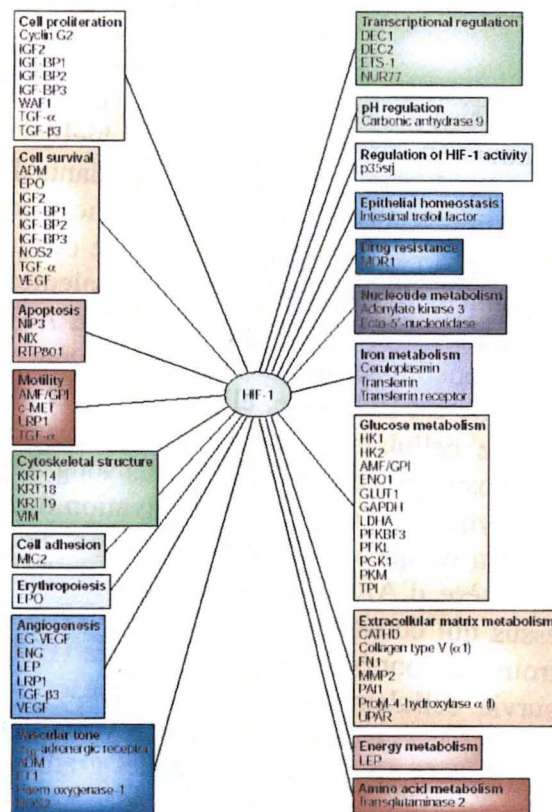


Table 1 : Gènes cibles de HIF-1 (Semenza, 2003).

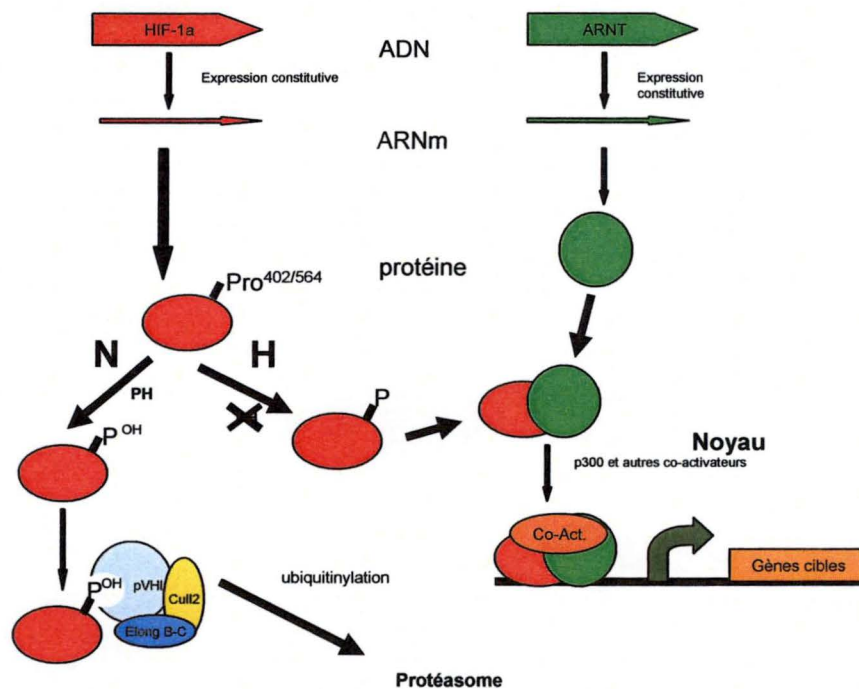


Fig.4: Représentation schématique de la voie de transduction du signal conduisant à l'activation de HIF-1 en hypoxie.

En normoxie, la prolyl hydroxylase (PH) est capable d'hydroxyler HIF-1 α grâce à la présence d'oxygène, ce qui permet la reconnaissance de HIF-1 α par le pVHL et sa dégradation ultérieure par le protéasome.

En hypoxie, la prolyl hydroxylase n'est plus active et dès lors, HIF-1 α n'est plus hydroxylé ni reconnu par pVHL, ce qui lui permet de s'hétérodimériser avec ARNT et d'exercer son activité transcriptionnelle.

2. HIF-1

2.1 Introduction

En situation d'hypoxie prolongée, la cellule est confrontée à la nécessité de s'adapter, de façon à s'assurer un approvisionnement suffisant en ATP, et d'essayer de rétablir un taux d'oxygénation adéquat (Semenza, 2002). Cette adaptation passe par l'activation d'un facteur transcriptionnel clé, HIF-1, que nous détaillons ci-dessous.

2.2 Description (Figure 2)

HIF-1 est un hétérodimère, constitué de 2 sous-unités : HIF-1 α et HIF-1 β ou ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Ces sous-unités contiennent respectivement 826 et 789 acides aminés chez l'homme (Gothié *et al*, 2002). Les sous-unités α et β comprennent un domaine bHLH (basic-Helix Loop Helix) et deux domaines PAS (A et B) (PER /ARNT/SIM : PER, SIM chez la drosophile, ARNT chez les vertébrés), qui sont impliqués dans la dimérisation de la protéine. La région basique du domaine bHLH est impliquée dans la liaison et la spécificité de la liaison à l'ADN (Jiang *et al*, 1996).

HIF-1 α contient d'autres domaines importants pour son rôle de régulateur transcriptionnel. Tout d'abord, ses deux domaines de transactivation, situés dans la partie carboxy-terminale : TAD-N (transcriptional activation domain, acides aminés 531-575, NAD) et TAD-C (acides aminés 813-826, CAD), séparés par un domaine inhibiteur de la transcription (Ruas *et al*, 2002) (Figure 3).

Ensuite vient un domaine ODD (oxygen-dependent degradation domain) compris entre les acides-aminés 401 et 603, qui est responsable de la dégradation par le protéasome de HIF-1 α en normoxie. Les régions 401-496, 497-529 et 530-603 sont capables de conférer une induction de HIF-1 α par l'hypoxie à des degrés différents.

Deux séquences PEST (Proline, Glutamate, Sérine, Thréonine) de 20 acides aminés ont été découvertes à la fin de l'ODD (acides aminés 499-518 et 581-600), qui contribuent à la reconnaissance par le protéasome.

Enfin, deux séquences de localisation nucléaire ou NLS (nuclear localisation sequence) ont été décrites : la première possède une séquence ¹⁷RRKEKSRDAARSRRSKE³³ et qui est située au niveau du domaine bHLH. Cette séquence semble être réprimée sur la protéine entière. La seconde séquence ⁷¹⁸RKRK⁷²¹ est apparentée au NLS retrouvé dans l'antigène grand-T de SV-40, et jouerait un rôle clé dans l'import nucléaire de HIF-1 α dépendant de l'hypoxie.

Il existe différentes isoformes de HIF- α ; HIF-1 α ubiquiste, HIF-2 α , répertorié comme endothelial PAS domain 1 (EPAS1) et HIF-3. Ces isoformes ont une similarité structurelle et sont classées dans la famille des protéines à domaine bHLH-PAS.

ARNT contient aussi un domaine TAD dans sa partie carboxy-terminale, mais ce dernier n'est pas impliqué dans la réponse transcriptionnelle à l'hypoxie.

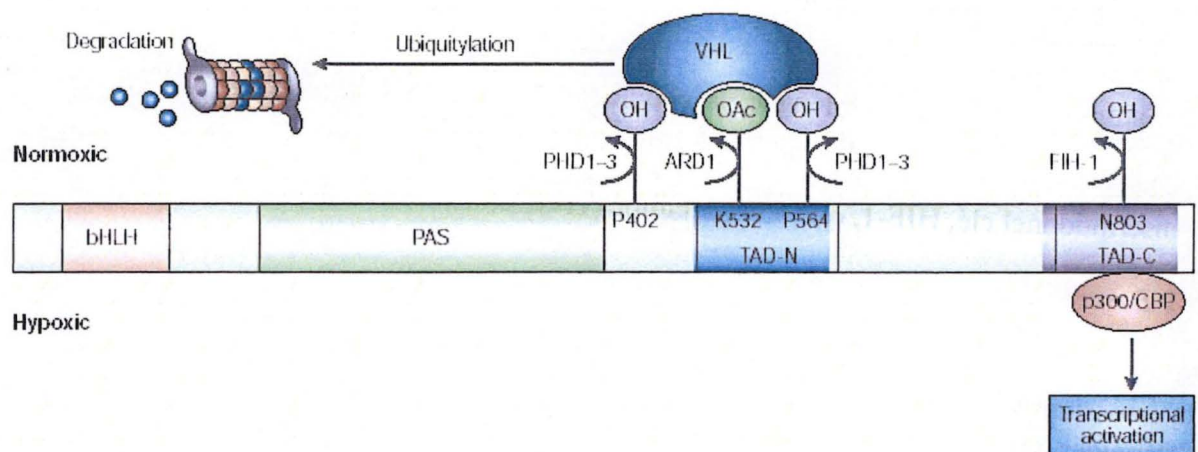


Fig. 5 : Régulation de HIF-1 dépendante de l'oxygène : (Semenza, 2003)

Deux hydroxylations et une acétylation permettent la fixation de pVHL à HIF-1 α qui est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Une hydroxylation empêche la fixation de CBP/p300 au domaine C-terminal de HIF-1 α et donc réprime l'activation transcriptionnelle de HIF-1.

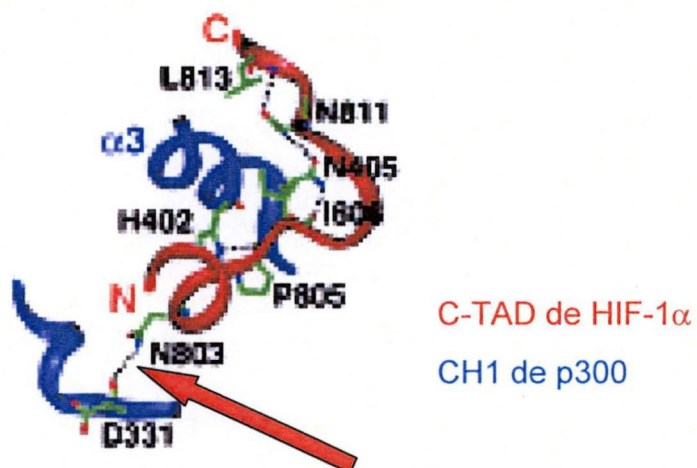


Fig. 6 : Représentation de l'asparagine 803, qui hydroxylée, empêche l'interaction (Flèche rouge) entre HIF-1 α et p300 (Freedman et al, 2002).

2.3 Gènes-cibles

Plus de 60 gènes directement ciblés par HIF-1 ont été répertoriés (Table 1). La plupart d'entre eux sont impliqués dans la réponse adaptative des cellules et des tissus aux conditions d'hypoxie.

2.3.1 Mécanismes de régulation dépendants de l'oxygène (Figures 4 et 5)

HIF-1 est régulé par différents processus, qui incluent des modifications post-traductionnelles, la translocation nucléaire et le recrutement de cofacteurs. La sous-unité HIF-1 α est la sous-unité régulée par la concentration en oxygène, contrairement à ARNT qui est exprimé constitutivement et dont l'activité est indépendante de l'hypoxie. L'expression de l'ARNm de HIF-1 α est stable et constitutive dans la plupart des cellules (figure 4). La synthèse et la dégradation de la protéine HIF-1 α sont régulées par des mécanismes dépendants et indépendants de l'O₂.

En normoxie, il y a hydroxylation des prolines 402 et 564 (situées au niveau de l'ODD) par les proline hydroxylases-1, 2 et 3. Ces proline hydroxylases sont présentes dans différents compartiments cellulaires : HPH-3 est prédominante dans le noyau tandis que HPH-2 est située essentiellement dans le cytoplasme (Huang *et al*, 2002 ; Metzen *et al*, 2003). Les proline hydroxylases utilisent de l'oxygène moléculaire et de l' α -cétoglutarate comme substrats dans une réaction qui génère HIF-1 α -prolyl hydroxylé et du succinate. Un des atomes d'oxygène sera transféré sur le résidu proline, tandis que le second réagit avec l' α -cétoglutarate pour générer du succinate. Ces prolines hydroxylées sont ensuite reconnues par le facteur suppresseur de tumeur de Von Hippel-Lindau (pVHL) qui se fixe via son domaine β à l'ODD de HIF-1 α (Jaakola *et al*, 2001). Le pVHL est le composant de reconnaissance d'un complexe E₃ ubiquitine ligase qui cible HIF-1 α pour la dégradation par le protéasome. Le pVHL recrute d'autres protéines, comme la culline-2 et les élongines B et C (Figure 4), et forme avec elles un complexe présentant une activité E₃ ubiquitine ligase. HIF-1 α ubiquitinylé est reconnu par le protéasome, ce qui explique sa dégradation rapide en normoxie (temps de demi-vie de 5 minutes). L'acétylation de la lysine 532 par ARD1 acétyltransférase favorise également l'interaction de HIF-1 α avec pVHL (Ivan *et al*, 2001), participant ainsi aussi à son ubiquitinylation et à sa dégradation. L'acétylation diminue graduellement au fur et à mesure que la durée d'exposition à l'hypoxie augmente.

En hypoxie, on observe une augmentation de la quantité de HIF-1 α dans tous les types cellulaires ; cette accumulation est due à une diminution de la dégradation de la protéine (Huang *et al*, 1996 ; Kallio *et al*, 1997). L'hydroxylation des prolines 402 et 564 par les HPHs est inhibée par manque de l'un des substrats, l'oxygène, ce qui empêche l'interaction avec pVHL. HIF-1 α , stabilisé, est ensuite importé dans le noyau. Cette étape est dépendante de son signal de localisation nucléaire, placé en position carboxy-terminale. La dimérisation entre HIF-1 α et ARNT, qui est strictement confinée au noyau, (Pollenz *et al*, 1994 et Eguchi *et al*, 1997) s'ensuit, ce qui permet sa fixation aux sites HRE (hypoxia response element). L'hétérodimère (HIF-1 α -ARNT) s'associe à des cofacteurs (p300/CBP), allumant dès lors son activité trans-activatrice (Ebert *et al*, 1998).

2.3.2 Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1

L'activité de HIF-1 est aussi régulée de manière dépendante de l'oxygène, via le FIH-1 (Factor Inhibiting Hif-1). Le FIH-1 induit l'hydroxylation de l'Asparagine 803, ce qui empêche le TAD-C de HIF-1 α d'interagir avec p300 ou CBP, en condition de normoxie (Lando *et al*, 2002 ; Sang *et al*, 2002). La structure montre comment l'hydroxylation de l'Asparagine 803 est susceptible de déstabiliser le complexe. Le carbone β de la chaîne latérale de l'Asn 803 est hydroxylé en normoxie, ce qui empêche l'interaction de se faire (Figure 6)

En hypoxie, FIH-1 n'est plus capable de modifier HIF-1 α , ce qui permet la transactivation via le C-TAD. FIH-1 régule ici une interaction protéine-protéine, mais contrairement à d'autres interactions protéine-protéine, celle-ci est fonction de la disponibilité en oxygène. FIH-1 est une enzyme dépendante d'un Fe⁺⁺ et de l' α -cétoglutarate, et requiert aussi de la vitamine C pour permettre le maintien du fer à l'état réduit (Lando *et al*, 2002). FIH-1 pourrait servir de second senseur d'oxygène (le premier étant la proline hydroxylase) du fait de l'utilisation d'oxygène comme substrat.

2.3.3. CBP/p300

2.3.3.1 Description

Les deux co-activateurs CBP (CREB binding protein) et p300 sont capables d'interagir avec HIF-1 (Dames *et al*, 2001). Ce sont des coactivateurs transcriptionnels qui se lient aux domaines transactivateurs d'un grand nombre de facteurs transcriptionnels afin d'augmenter la transcriptions des gènes cibles. Ces coactivateurs ont de plus une activité histone acétyl-transférase.

2.3.3.2 Régulation

L'interaction des deux co-activateurs CBP et p300 avec HIF-1 α est régulée positivement par la réduction du groupement sulfhydryl d'une cystéine localisée dans le domaine C-terminal de HIF-1 α (Ema *et al*, 1999) et négativement par l'hydroxylation de l'asparagine 803 du C-TAD de HIF-1 α par FIH-1. Ces deux réactions modulent les interactions entre CBP/p300 et HIF-1 α (Semenza, 2002).

Le domaine CH1 (Cystéine/Histidine rich 1) de p300 interagit avec le domaine C-TAD de HIF-1 α . CH1 et CH3 sont des domaines de liaison Zn⁺⁺ homologues de CBP/p300, contenant de nombreux résidus cystéine et histidine (Fig.7). En dépit de leur structure prédite très similaire, il semble que les facteurs de transcription auxquels se lient ces domaines soient différents (Grossman *et al*, 1998 ; Grossman, 2001). L'analyse structurale montre que le domaine CH1 fournit une échelle qui induit le repliement de C-TAD sur HIF-1 α (Freedman *et al*, 2002). Plus des trois-quarts des 40 résidus du C-TAD de HIF-1 α contactent le domaine CH1 de p300 et les deux protéines interagissent pour former un seul domaine structural avec un

cœur hydrophobe commun. Il semble que l'interaction entre CH1 et C-TAD soit de nature hydrophobe et/ou polaire (Freedman *et al*, 2002).

2.3.4 Mécanismes de régulation de la synthèse de HIF-1 α indépendants de l'oxygène (Figure 8)

Outre les conditions d'hypoxie, l'accumulation de HIF-1 α peut être induite par différents facteurs de croissance et cytokines. Dans ce cas, il semblerait que ce soit une augmentation de la synthèse protéique de HIF-1 α qui soit responsable de cette accumulation. On commence à connaître les mécanismes responsables de cette induction.

Lorsque l'hormone se fixe à son récepteur de type tyrosine kinase ou associé à une tyrosine kinase, différentes voies de transduction du signal (PI3K, MEK) sont allumées. Elles conduisent entre autres à l'activation par phosphorylation de mTOR (PI3K) et de ERK (MEK). ERK et mTOR phosphorylent S6K (une kinase ciblant la protéine ribosomale S6) et 4E-BPI (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein). La protéine S6K s'active, tandis que 4EBPI est inhibé. 4E-BPI ne pourra dès lors se fixer à eIF-4E (eukaryotic initiation factor-4E) qui est alors libre d'exercer sa fonction. La phosphorylation de S6 et l'inhibition de 4E-BPI contribuent à augmenter la traduction de la protéine HIF-1 α .

Il faut cependant noter que la régulation de l'activité de HIF-1 par les facteurs de croissance ou cytokines est spécifique de certains types cellulaires, contrairement à l'hypoxie qui induit une stabilisation de la protéine HIF-1 α et une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 dans tous les types de cellules (Semenza, 2003).

2.3.5 Rôle des kinases dans l'activation de HIF en hypoxie

HIF-1 est une protéine phosphorylée, et sa phosphorylation est impliquée dans la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α et dans la régulation de son activité transcriptionnelle (Wang *et al*, 1993 ; Wang *et al*, 1995 ; Salceda *et al*, 1997). Nous décrirons deux voies de transduction du signal, PI-3 Kinase/Akt et ERK, qui aboutissent à des phosphorylations directes ou indirectes de HIF-1 et qui ont comme conséquence respectivement la stabilisation de HIF-1 α et la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en hypoxie.

2.3.5.1 Voie de la PI-3 Kinase

Si la stabilisation de HIF-1 α en hypoxie est principalement régulée par l'inhibition de l'hydroxylation des deux prolines, il semblerait que la voie de la PI3 kinase soit également impliquée. En effet, son inhibition, par exemple en utilisant la wortmanine ou le LY 294002, diminue la quantité de protéine HIF-1 α qui s'accumule en hypoxie (Mottet *et al*, 2003). Comme il n'y a pas de site consensus de phosphorylation par la PI3 kinase sur HIF-1 α , l'intervention d'une ou de plusieurs kinases intermédiaires est à envisager ; la glycogène synthase kinase pourrait être ce candidat.

2.3.5.2 Voie des ERKs

La régulation transcriptionnelle de HIF-1 dépend également de l'activité de kinases. Nous avons ainsi montré au laboratoire que si les MAP kinases ERK sont inhibées pendant l'hypoxie, on diminue fortement l'activité transcriptionnelle de HIF-1 mesurée par un système rapporteur ou en suivant la sécrétion du VEGF. Cette inhibition s'observe sans changements de la quantité de protéine HIF-1 α (Minet *et al*, 2000). Ce serait donc probablement en régulant l'interaction de HIF-1 α avec les coactivateurs que les kinases ERK moduleraient positivement l'activité de HIF-1. Une phosphorylation directe de TAD-C de HIF-1 α par ERK1 en hypoxie a été démontrée expérimentalement (Minet *et al*, 1999).

D'autres kinases jouent un rôle direct ou indirect dans la régulation de HIF-1, et l'une d'elles est décrite ci-après. Il s'agit de la caséine kinase 2.

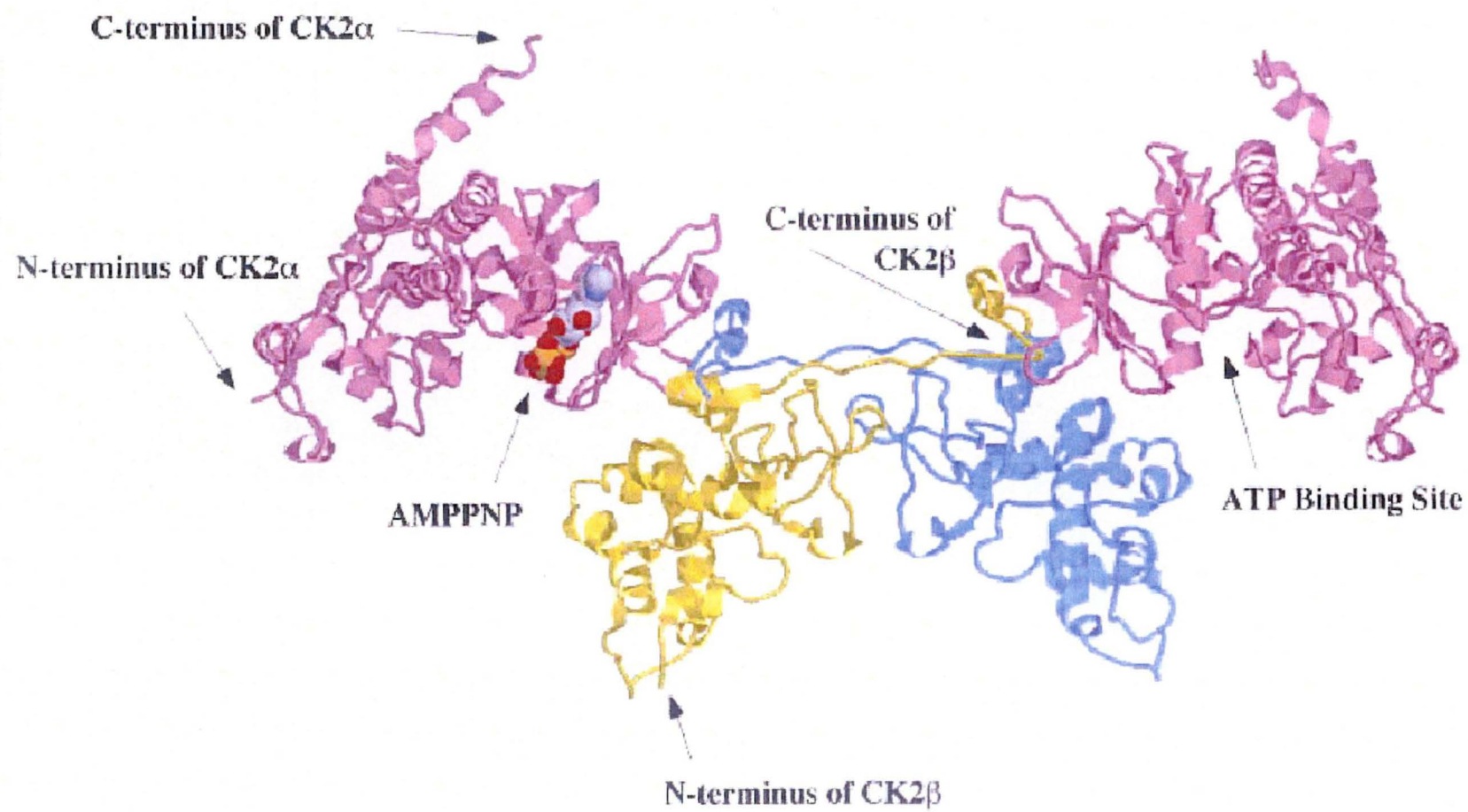


Fig. 9 : Structure de la CK2 (Lietchfield et al, 2003).

3. CK2

3.1 Description

La caséine kinase 2 (CK2) est une sérine/thréonine kinase qui interagit avec de nombreuses voies métaboliques. Il s'agit d'une des protéines les plus conservées chez les eucaryotes.

Elle comprend 2 sous-unités catalytiques α ou α' (38 et 42 kDa) et deux sous-unités β régulatrices (27 kDa) qui peuvent s'associer pour former une holoenzyme $\alpha_2\beta_2$, $\alpha'_2\beta_2$ ou $\alpha\alpha'\beta_2$ (Figure 9). Cette structure est tétramérique (Allende *et al*, 1995 ; Guerra et Issinger, 1999).

3.1.1 La sous-unité catalytique CK2 α

CK2 α est constituée de deux lobes : une partie N-terminale riche en feuillets β et une partie C-terminale constituée d'hélices α . Les deux lobes délimitent le site catalytique, qui dans le cas de la CK2 est largement accessible du fait de l'interaction entre l'extrémité N-terminale de la kinase et sa boucle d'activation. La conformation particulière de son site catalytique explique que la CK2 soit l'une des rares protéines kinases utilisant indifféremment l'ATP ou le GTP comme nucléotide donneur de phosphates. La sous-unité catalytique est constitutivement active, associée ou non à la sous-unité régulatrice. Il existe de plus une sous-unité α' , possédant une homologie très forte avec la CK2 α (98%) et capable de suppléer partiellement un déficit de la CK2 α . Le développement normal de souris knock-out pour CK2 α' permet de suggérer un recouvrement de fonctions entre CK2 α et CK2 α' .

3.1.2 La sous-unité régulatrice CK2 β (Figures 10 et 11)

La sous-unité β est très conservée (pas de différences entre les mammifères et les oiseaux), ce qui laisse supposer que ses fonctions sont d'une grande importance. L'activité basale de la CK2 est fortement modulée par la sous-unité β . La phosphorylation de nombreux substrats par la CK2 est dépendante de la présence de la sous-unité CK2 β .

La dimérisation entre les deux sous-unités β s'effectue grâce à quatre cystéines (Cys 109,114,137,140). L'interface, très réduite, repose sur une structure en doigts de zinc (Figure 11). La région C-terminale régule les interactions avec CK2 α et favorise la stabilité du tétramère (Khalil *et al*, 2002). CK2 β sert de plate-forme d'assemblage pour les sous-unités α . Le caractère flexible des contacts entre sous-unités suggère un équilibre entre les formes associées et dissociées.

La CK2 β comprend une « destruction box » qui ressemble à celle de la cycline et qui régule sa dégradation, mais dont on ignore si elle agit de concert avec d'autres signaux (Figure 11).

3.2 Cinétique et localisation cellulaire

La localisation par fluorescence des deux sous-unités de la CK2 (après fusion avec une protéine fluorescente, la GFP) a permis de montrer qu'elles sont transportées indépendamment dans le noyau de la cellule avec des cinétiques différentes. Ainsi, alors que la sous-unité régulatrice (CK2 β) est principalement localisée dans le noyau, la sous-unité catalytique

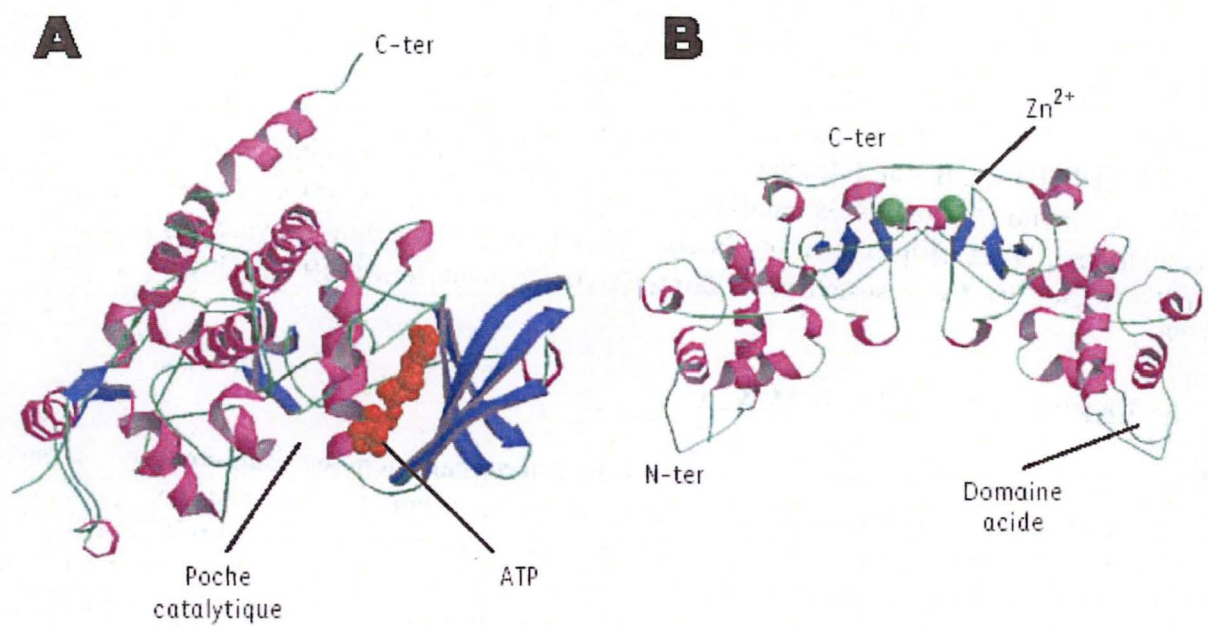


Fig.10: Représentation tridimensionnelle des sous-unités α (A) et β (B) de la CK2 (Freedman et al, 2002).



Fig.11: Représentation schématique des domaines de la sous-unité β de la CK2 (Freedman et al, 2002).

(CK2 α) transite en permanence entre le noyau et le cytoplasme. Lorsque les sous-unités α et β s'associent, le complexe résultant se situe dans le cytoplasme. Cependant, la liaison du FGF-2 (fibroblast growth factor 2) à ce complexe provoque son accumulation dans le noyau.

Les sous-unités α et β ont une interaction qui semble très dynamique, et sont capables d'interagir avec de nombreux partenaires différents et ainsi, deviennent capables de participer à la formation de complexes distincts. Toutefois, la haute affinité existant entre les 2 sous-unités de la protéine a créé une controverse relative à l'existence possible de sous-populations indépendantes de ces molécules dans la cellule. Des études cristallographiques ont été réalisées, et il semble que la surface de contact entre les 2 sous-unités soit beaucoup plus petite que les surfaces de contact habituellement décrites chez les complexes protéiques stables. Ceci permet de suggérer que la forme d'holoenzyme est une forme transitoire (Niefind *et al*, 2001)

L'identification de nombreuses protéines interagissant avec la CK2 a renforcé l'idée selon laquelle les deux sous-unités pourraient avoir d'autres fonctions biologiques que celles attribuées à l'holoenzyme (Filhol *et al*, 2004). Par exemple, la sous-unité β est capable d'interagir avec des protéines kinases importantes, comme A-Raf, c-Mos (Guerra et Issinger, 1999), p90rsk, PKC γ (Brenn *et al*, 2000) et Chk1 (Guerra *et al*, 2003). Dans un screening double-hybride, plus de 40 protéines différentes ont été identifiées comme interagissant avec CK2 β . Cependant, la signification physiologique de ces interactions reste encore à découvrir.

3.3 Fonctions

La protéine kinase CK2 présente un mode de régulation complexe de son activité. Elle est un acteur clé de la transmission de signaux cellulaires essentiels pour le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. La CK2 phosphoryle plus de 160 substrats différents, impliqués dans la transduction du signal, dans le contrôle transcriptionnel, dans la régulation du cycle cellulaire, dans le métabolisme, etc... (Pinna et Meggio, 1997). Certaines de ces fonctions seront brièvement décrites ci-dessous.

3.3.1 La CK2 favorise la survie cellulaire

Une des fonctions clef de la CK2 est le maintien de la survie cellulaire. Chez la souris, CK2 α' est produite préférentiellement au cours des dernières étapes de la spermatogenèse, et la disruption de ce gène augmente le nombre de cellules apoptotiques *in vivo*. L'invalidation des deux gènes codant pour les sous-unités α et α' est létale chez la souris. Chez *C. elegans*, l'inactivation de la CK2 β par RNAi provoque une augmentation de la létalité embryonnaire. Chez la souris, la délétion des allèles codant pour la sous-unité β a des effets délétères sur les premiers stades du développement embryonnaire: l'absence de cette sous-unité bloque le développement à un stade embryonnaire précoce et conduit à une dégénérescence cellulaire totale.

Chez la levure, l'invalidation des gènes CK2B1 et CK2B2 provoque une sensibilité aux cations Li⁺ et Na⁺. Chez la souris, invalider CK2 β provoque la mort à un stade précoce du développement embryonnaire par malformation du système vasculaire.

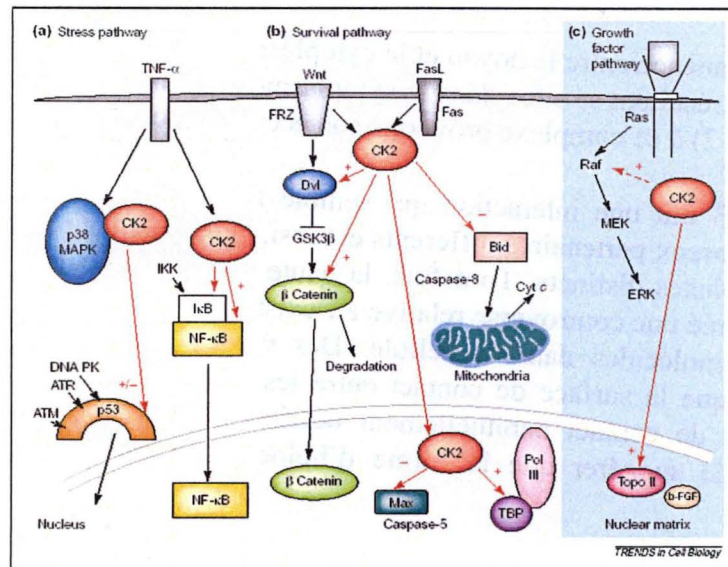


Fig. 12 : Régulation de la CK2 (Khalil et al, 2002).

Implication de la protéine CK2 dans la survie cellulaire. Lors d'une réponse inflammatoire, la protéine IκB, qui maintient normalement dans le cytoplasme le facteur NF-κB sous une forme inactive, est dégradée. La CK2 fait partie des kinases qui régulent la dégradation de IκB et stimulent l'activité transcriptionnelle de NF-κB. La voie de signalisation dépendante du signal Wnt-1 contribue à l'augmentation de la survie cellulaire en bloquant l'apoptose, notamment via la phosphorylation de Bid par la CK2.

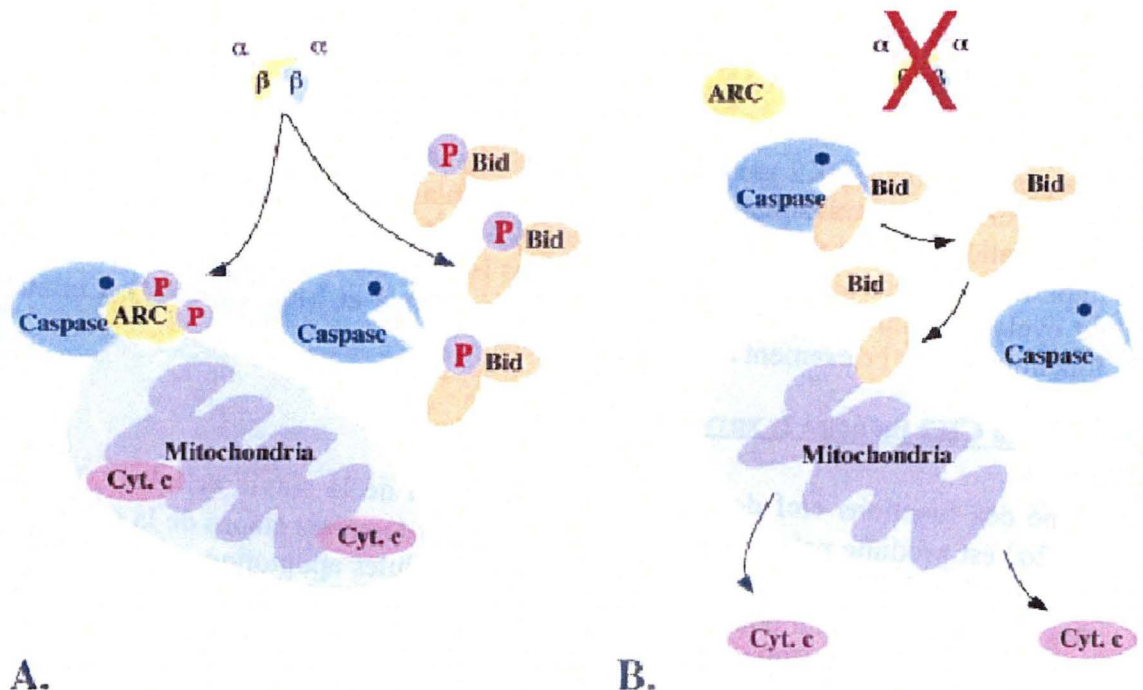


Fig. 13 : Régulation de l'apoptose par la CK2 (Freedman et al, 2002).

- En conditions de survie, la CK2 phosphoryle des protéines comme ARC et Bid. ARC phosphorylé interagit avec la caspase 8, empêchant ainsi son activation. Par ailleurs, CK2 phosphoryle Bid, ce qui empêche son clivage par la caspase 8, et ainsi la libération induite par la forme clivée de Bid, du cytochrome c indispensable à la formation de l'apoptosome.
- Lorsque survient le signal apoptotique, ou lorsque CK2 est inactive, les phosphorylations de ARC et Bid n'ont pas lieu, ce qui aboutit à l'apoptose par l'activation de la caspase 8.

Les différents exemples exposés ci-dessus montrent que l'invalidation de l'une ou l'autre des sous-unités amène une diminution de la viabilité cellulaire *in vivo* et *in vitro* suggérant qu'elles sont toutes les deux importantes pour maintenir une cellule en vie.

3.3.2 La CK2 est un anti-apoptotique

La voie dépendante du ligand Wnt-1, une fois réactivée, empêche l'apoptose (Khalil *et al*, 2002). Le ligand Wnt vient se fixer sur son récepteur FRZ (frizzled), qui active la CK2. La CK2 participe à la formation d'un complexe contenant Dishevelled et la β -caténine (Figure 12). La CK2 phosphoryle la β -caténine et la stabilise, permettant ainsi sa translocation nucléaire (Khalil *et al*, 2002) où elle sert de cofacteur pour des High Mobility Group Box Transcription Factors, régulant ainsi l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire (Song *et al*, 2000). De plus, la CK2 phosphoryle Bid (une protéine importante dans la transduction du signal pro-apoptotique) près du site de reconnaissance de la caspase 8 (qui clive Bid en un fragment plus court qui est transloqué vers la mitochondrie où il induit le largage du cytochrome c, et la formation de l'apoptosome), empêchant ainsi le clivage de Bid (Figure 13). Il existe d'autres protéines dont les rôle et structure sont semblables à Bid : Max, Myc, Mad, également impliqués dans les mécanismes propagateurs des signaux apoptotiques. Certains sont également inhibés par phosphorylation par la CK2. La CK2 empêche donc l'initiation de l'apoptose au niveau de la mitochondrie (Buchou *et al*, 2003). Cet effet est renforcé par une deuxième action de la CK2. La protéine ARC est cytoplasmique et est un inhibiteur de la caspase 8. Lorsque CK2 phosphoryle ARC, celle-ci est transloquée dans la mitochondrie où elle interagit avec la caspase 8 afin de prévenir son activation et donc la fonction de l'apoptosome (Figure 13).

Finalement, la CK2 inhibe PTEN en phosphorylant son extrémité régulatrice C-terminale. La CK2 bloque ainsi l'intégration de la phosphatase PTEN dans un complexe macromoléculaire nécessaire pour son adressage vers la membrane plasmique. Le produit du gène suppresseur de tumeur PTEN est une phosphatase qui bloque l'action anti-apoptotique de la PI-3 kinase. En bloquant PTEN, la CK2 favorise donc l'action de la PI-3 Kinase.

La CK2 favorise également la dégradation de I κ B, stimulant ainsi l'activité transactivatrice de NF κ B. La dégradation de I κ B découvre le NLS de NF κ B et permettra la translocation de celui-ci dans le noyau où il joue son rôle de transactivateur, notamment de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (cytokines, molécules d'adhésion, récepteurs immunitaires, et promoteur de CK2) mais également de gènes antiapoptotiques comme les IAP (inhibitors of apoptosis).

3.4 Régulations

La régulation de la CK-2 est un mécanisme complexe qui n'est pas encore totalement compris à l'heure actuelle. On pense que la localisation subcellulaire et l'abondance respectives des différentes sous-unités sont importantes. En effet, il existe des séquences de localisation nucléaire sur chaque sous-unité de la CK-2, ce qui permet une importation indépendante de ces sous-unités dans le noyau. Si les deux sous-unités sont associées, l'importation nucléaire devient impossible. Une fois les deux sous-unités arrivées dans le noyau, seule la sous-unité catalytique pourra être réexportée vers le cytoplasme.

La localisation et l'interaction entre les sous-unités sont des phénomènes très dynamiques qui seraient déterminants pour la reconnaissance des substrats de la kinase. Il existe des différences de spécificité de substrat entre la sous-unité catalytique associée à la sous-unité régulatrice et la sous-unité catalytique seule (Martel *et al*, 2002). Les sous-unités catalytiques seules sont spontanément actives *in vitro* sur de nombreux substrats protéiques. La liaison à la sous-unité régulatrice pourrait résulter dans la phosphorylation d'une série de substrats qui ne seraient que peu ou pas phosphorylés en son absence. Ceci signifie que tout changement de l'expression de CK2 β pourrait mener à un bouleversement de l'équilibre entre les CK2 phosphorylées et les substrats spécifiques de l'holoenzyme. Certains substrats de la CK2 ne sont présents que dans certains compartiments cellulaires et sont propres à ces compartiments (Filhol *et al*, 2003). Il est donc peut-être nécessaire d'avoir la tétramérisation appropriée de l'enzyme dans chacun de ces compartiments.

Les petits substrats, liés à la sous-unité catalytique (CK2 α), forment des petits complexes, qui sont souvent reliés entre eux par le dimère CK2 β (Guerra et Issinger, 1999 ; Litchfield, 2003). Ceci amène la possibilité de la formation de réseaux tridimensionnels comprenant les sous-unités catalytiques liées à leurs substrats et les sous-unités régulatrices servant à maintenir la cohésion entre les complexes formés par les sous-unités catalytiques et leurs substrats (Pinna, 2002).

L'activité de CK2 était considérée jusqu'à présent comme constitutive, c'est-à-dire que CK2 serait active tout le temps. Il semblerait maintenant que la régulation de l'association des sous-unités α et β et/ou de la localisation subcellulaire puissent moduler cette activité. Par contre, jusqu'à présent, aucune régulation par une voie de transduction du signal classique n'a été décrite.

3.4.1 Exemples de dérégulations : les cancers

Dans la plupart des cancers, on a remarqué une augmentation importante de l'activité de CK2. Cette augmentation a longtemps été prise comme un reflet de la prolifération cellulaire, mais des immunomarquages récents avec Ki-67 (un marqueur de prolifération standard) montrent des différences notables avec des immunomarquages de CK2. Cela sous-entend que l'augmentation de l'activité de CK2 n'est pas fonction de la prolifération cellulaire et donc que la CK2 jouerait un autre rôle encore ignoré.

L'implication de CK2 dans le déroulement du cycle cellulaire, lors des transitions de phases G₁-S et G₂-M (Hanna *et al*, 1995) est à mettre en parallèle avec le fait que de nombreux cancers possèdent une activité importante de la CK2 (Tawfic *et al*, 2001). Un dérèglement de cette enzyme pourrait conduire à des phosphorylations aberrantes de protéines impliquées dans la survie ou la prolifération de cellules cancéreuses et ainsi participer au processus de transformation.

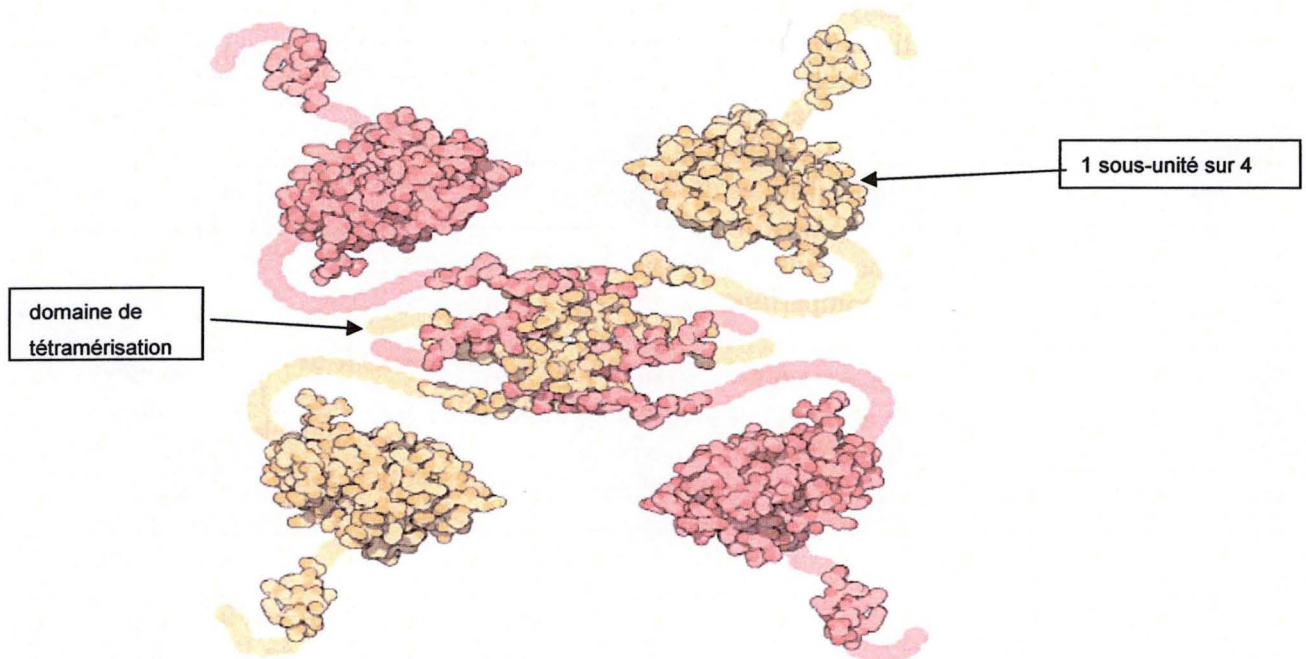


Fig. 14: Structure de p53 (www.rcsb.org/pdb/molecules/pdb31_1.html).

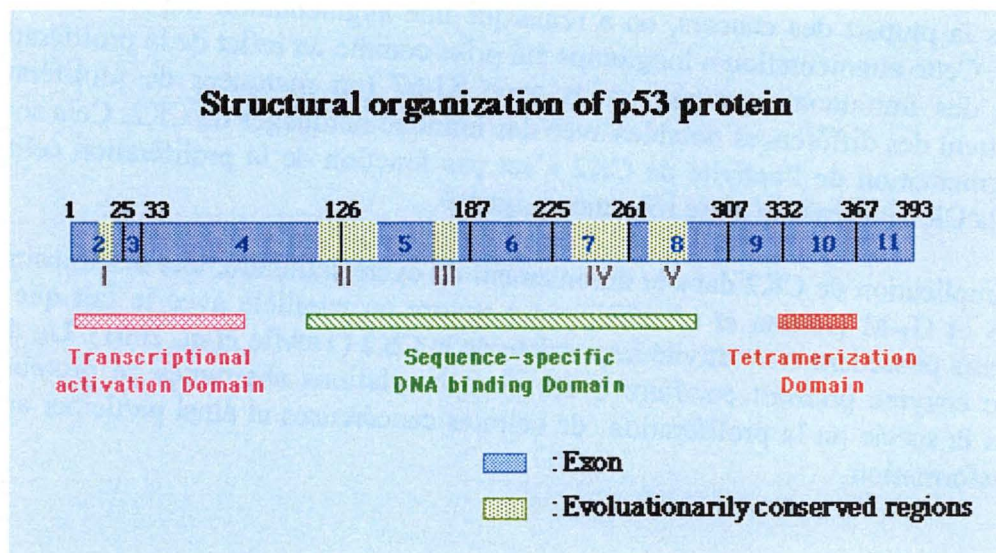


Fig. 15: Représentation schématique des différents domaines de p53 (www.chemio.uoguelph.ca/educmat/chm736/cancer.htm).

4. p53

4.1 Introduction

p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés, constituée de 4 sous-unités de 53 kDa, divisées chacune en trois domaines (Figure 14) (May, 1999). Il s'agit d'un homo-tétramère qui agit comme suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire lorsque des dommages à l'ADN surviennent. Dans une cellule normale, la durée de demi-vie de p53 se situe autour de 20 minutes.

p53 joue un rôle central dans un réseau régulateur complexe dans lequel on retrouve le contrôle du cycle cellulaire (l'arrêt du cycle cellulaire aux phases G₁/S et G₂/M si des dommages surviennent au niveau de l'ADN) (May, 1999), l'intégrité de l'ADN (lié au cycle cellulaire) et la mort cellulaire programmée (apoptose).

p53 régule de nombreux gènes ayant un rôle dans ce réseau régulateur, dont quelques-uns parmi les plus importants sont décrits dans la table 2.

4.2 Structure (Figure 15)

Chaque sous-unité est constituée de trois domaines distincts :

4.2.1 Domaine transactivateur (acides aminés 1-50)

Situé en région N-terminale, ce domaine permet le recrutement de la machinerie basale de transcription. Cette machinerie inclut différents constituants comme la TBP (TATA binding protein) et les TAFs (TBP associated factors), tous deux constituants du complexe TFIID (Lu and Levine, 1995 ; Thut *et al*, 1995). TBP interagit non seulement avec le domaine N-terminal, mais aussi avec le domaine C-terminal de p53. De plus, d'autres sites d'interactions avec des protéines ont été identifiés dans cette région : ce sont notamment les sites de liaison pour les coactivateurs CBP/p₃₀₀, d'autres sites de liaison pour la protéine RP-A qui se lie à l'ADN simple brin, pour la sous-unité p62 qui appartient au complexe de réparation transcriptionnel TFIIF et pour la protéine MDM2.

4.2.2 Domaine de liaison à l'ADN séquence-spécifique (acides aminés 102-292)

Ce domaine contient quatre régions (L1, L2, L3 et H) et est constitué d'un « core » compris entre les acides-aminoés 100 à 300 (Ashcroft *et al*, 2000), qui inclut le site de liaison à l'ADN proprement dit (Figure 15). Le tétramère se lie à 4 séquences consensus répétitives 5'-Pu-Pu-Pu (A/T)-C-3', formant 2 paires arrangées en « inverted repeats ». Ce site de liaison pour p53 est situé dans le promoteur des gènes cible de p53.



Chacune des quatre régions possède une conformation et une fonction qui lui sont propres. L1 est conformé en LSH (Loop Sheet Helix) et se fixe dans le sillon majeur de l'ADN, alors que L2 se place dans le petit sillon de l'ADN. L3 se place contre L1 et le stabilise. L2 et L3

Table 2: Tableau représentant certains gènes dont l'expression est régulée par p53. Ils jouent un rôle au niveau du cycle cellulaire, de l'apoptose ou dans la néoangiogenèse.

Gènes	Fonctions
p21 ^{WAF1/CIP1}	Inhibiteur de protéines kinases dépendantes des cyclines.
MDM2	Oncoprotéine se liant à p53 pour promouvoir sa dégradation (E ₃ ubiquitine ligase).
GADD45	Se lie au facteur de réplication PCNA et inhibe l'entrée de la cellule en phase S.
Cycline G	Elle est induite lorsque des dommages sont occasionnés à l'ADN.
Bax	Forme un hétérodimère avec Bcl2 et promeut l'apoptose.
IGF-BP3	Se lie au facteur de croissance IGF (insulin-like growth factor) et inhibe sa fonction d'activation de la croissance. Sert aussi de facteur de survie.
Thrombospondine-1	Inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

sont reliés par un atome de Zinc fixé aux cystéines 176, 179, 238 et 242 qui stabilise le domaine tout entier. La région H est conformée en LSH, comme L1.

4.2.3 Domaine de liaison non-spécifique à l'ADN et d'oligomérisation (acides aminés 323-393)

Les acides aminés 323-356 sont requis pour l'oligomérisation des sous-unités de la protéine. Les deux dimères se fixent l'un à l'autre par une vaste surface hydrophobe, présente sur chaque paire d'hélices. La tétramérisation est requise pour l'activité transactivatrice et pour la médiation de la suppression des tumeurs. Adjacente à la région d'oligomérisation se trouve une région basique (acides aminés 363-393) qui possède plusieurs fonctions. Cette région permet à la fois une régulation de l'apoptose, une régulation de l'activité transcriptionnelle et une liaison non-spécifique à l'ADN simple brin permettant la reconnaissance de dommages à l'ADN.

Ce domaine C-terminal régule également la liaison spécifique à l'ADN. L'activation de p53 peut être due à différentes modifications post-transcriptionnelles du domaine C-terminal, incluant des acétylations (Lysine 320 par PCAF, lysine 382 par p300), des glycosylations (Shaw *et al.*, 1996), des phosphorylations (Sérines 376 et 378 par la PKC, Sérine 392 par la CK2) et l'élimination pure et simple du domaine C-terminal par protéolyse (Okorokov *et al.*, 1997). Ces modifications activent p53 en provoquant un changement conformationnel de l'ensemble de la sous-unité. De plus, trois NLS (nuclear localization sequence) permettent la translocation et l'adressage de p53 vers le noyau : il s'agit des NLS1 (acides aminés 316-325), NLS2 (acides aminés 369-375) et NLS3 (acides aminés 379-384). Toutefois, l'effet du NLS1 est plus important que celui des autres NLS, la mutation de NLS1 aboutissant à la présence de p53 uniquement localisé dans le cytosol, alors que l'altération des NLS 2 et 3 aura pour résultat la localisation de p53 dans le cytoplasme et dans le noyau.

4.3 Régulation et modulation de la fonction de p53

4.3.1 Fonctions générales de contrôle de p53

p53 est l'acteur central d'un contrôle qui supervise le cycle cellulaire et qui l'interrompt lorsque l'ADN est endommagé ou lorsque d'autres problèmes se présentent. Si les cellules sont soumises à des rayonnements UV, leur ADN est endommagé et la concentration en p53 ainsi que son activité, augmentent jusqu'à réparation achevée ou mort programmée. Un des signaux connus pour favoriser l'activation de p53 est une cassure de l'ADN. L'activation de p53 peut mener à plusieurs choses :

4.3.1.1 Arrêt du cycle cellulaire (Figure 16)

L'activation de p53 peut mener à un arrêt du cycle cellulaire à des moments de transition importants. La protéine p53 est impliquée dans le contrôle de la transition entre les phases G₁ et S et entre les phases G₂ et M. L'arrêt est irréversible et les cellules peuvent survivre très longtemps dans cet état. Les radiations ionisantes provoquent des cassures dans l'ADN, ce qui provoque la liaison de p53 à l'ADN simple brin par son domaine C-terminal et sa phosphorylation par ATM, qui détecte aussi les cassures de l'ADN. Ces deux phénomènes assurent la stabilisation et l'activation de p53. La transcription du gène p21^{WAF1/CIP1} régulée

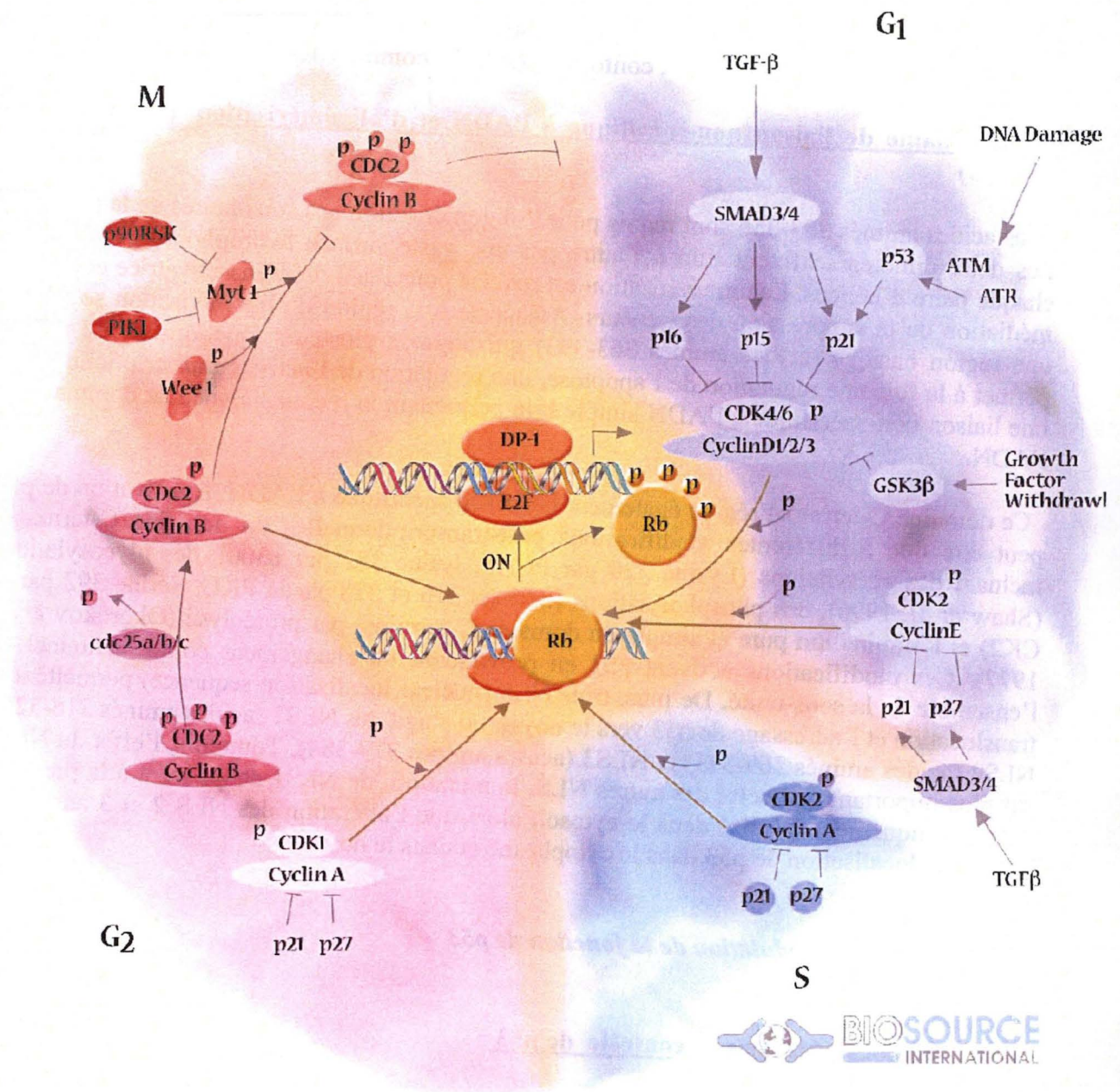


Fig.16: Représentation des niveaux d'intervention de p53 et de p21 lors du déroulement du cycle cellulaire. Le facteur de transcription p53 cible le gène p21, dont le produit inhibe les CDK (cyclin dépendant kinases), qui ne peuvent alors plus phosphoryler la protéine Rb. La protéine Rb est hypophosphorylée et se lie à E2F, qu'elle inactive, bloquant ainsi le cycle cellulaire en G1.

par p53 résulte en la production de la protéine p21, qui inhibe les kinases dépendantes des cyclines (Gartel *et al*, 2002). p21 inhibe les CDK (cyclin dépendant kinases) qui elles-mêmes phosphorylent la protéine Rb (retinoblastoma). La protéine Rb est hypophosphorylée et se lie à des facteurs transcriptionnels qui favorisent la phase S (famille des E2F), les séquestrant et les inactivant, ce qui bloque le déroulement du cycle en G1. D'autre part, p21 possède un site de liaison pour une protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Luo *et al*, 1995) qui est une protéine intervenant au niveau de la réplication de l'ADN. Cette protéine fixe l'ADN polymérase δ à l'ADN, accroissant ainsi la synthèse de l'ADN. La protéine p21 se lie à PCNA, le séquestrant et freinant ainsi la réplication de l'ADN. p53 active en plus un élément 14-3-3 σ qui induit l'arrêt en G2.

4.3.1.2 Initiation de l'apoptose

Outre l'arrêt du cycle cellulaire, p53 peut également initier l'apoptose, notamment en augmentant la transcription du gène codant pour la protéine pro-apoptotique Bax. Bax se fixe au complexe formé par Bcl2-Apaf1-Casp9, situé dans la membrane mitochondriale externe. La liaison de Bax à ce complexe engendre la formation d'un autre complexe entre Bcl2-Bax qui permettra au cytochrome c situé dans l'espace intermembranaire mitochondrial de sortir dans le cytosol. Par ailleurs, Apaf-1 et la procaspase 9 sont libérés. Les complexes Apaf-1-Casp9-Cyt c, appelés apoptosomes se forment alors. Les pro-caspases 9 se clivent l'une l'autre car elles se sont rapprochées et on passe d'une activité faible à des caspases activées, conduisant au phénotype apoptotique des cellules. Outre l'implication de Bax au niveau de la formation de l'apoptosome, Bax est antagoniste de l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (White, 1998) et de IGF-BP3 (Buckpinder *et al*, 1995), qui séquestre le facteur de survie IGF2 (insulin-like growth factor).

4.3.2 Mécanismes d'activation de p53

Dans une cellule normale, le niveau protéique de p53 est maintenu à un niveau faible par une dégradation médiée par le protéasome. De plus, dans les cellules au repos, p53 existe sous une forme latente, qui pour s'activer, doit recevoir un signal résultant de situations de stress. Ces situations de stress peuvent être de différentes natures, par exemple, l'activation de p53, en réponse à un signal potentiellement oncogène (croissance anarchique, ADN endommagé) dépend pour une part de la stabilisation de la protéine p53 et dans une moindre mesure, de son activation. Des dommages à l'ADN de nature différente peuvent activer p53, comme des ruptures au niveau de l'ADN double brin résultant d'irradiations aux rayons γ ou la présence d'intermédiaires de réparation d'ADN après irradiation aux UV ou attaque chimique. De plus, d'autres stimuli sont susceptibles d'induire l'activation de p53, de façon différente : l'hypoxie ne provoque pas d'arrêt du cycle cellulaire p53 dépendante, alors que des stress aux UV induisent ces mécanismes. En effet, dans le cas d'une hypoxie, l'ADN n'est pas touché, ce qui n'est pas le cas dans le cas d'un stress aux UV. De plus, différents degrés d'hypoxie induisent différentes réactions de p53 : l'anoxie (hypoxie sévère, concentration en $O_2 < 0,2\%$) induira une stabilisation de la protéine p53, alors qu'une hypoxie plus modérée ($1-2\%$ d' O_2) induira une diminution de la quantité de p53. D'autres stimuli peuvent être mis en cause : certaines cytokines, des changements métaboliques, des infections virales et des oncogènes activés.

p53 est au départ en faible quantité en raison d'une dégradation à laquelle participe MDM2 (voir plus loin). Un signal sera perçu par un senseur et transmis par des mécanismes encore mal connus, pour finalement aboutir à une kinase qui phosphoryle p53.

Cette phosphorylation provoque un changement conformationnel qui d'une part inhibe la dégradation médiée par MDM2 et d'autre part augmente l'activité transactivatrice de p53. Il est probable que d'autres mécanismes, comme des acétylations, d'autres phosphorylations et des interactions avec d'autres protéines interviennent également.

Certains agents endommageants de l'ADN peuvent induire des phosphorylations au niveau de certains sites du domaine N-terminal de p53 (résidus 15, 20, 33, 37 et 46) (Banin *et al*, 1998 ; Canman *et al*, 1998). Des phosphorylations au niveau des sérines 15, 20 et 37 ont été démontrées comme diminuant la liaison entre p53 et MDM2 *in vitro* (Shieh *et al*, 1997). Le remplacement des sérines 15 et 37 par un acide aspartique protège partiellement p53 de la dégradation via MDM2 (Ashcroft *et al*, 1999). Ceci suggère l'existence de voies métaboliques indépendantes, aboutissant à la phosphorylation et à la stabilisation de p53. Les meilleures kinases candidates pour être responsables de la phosphorylation de la sérine 15 sont ATM et ATR (Tibbetts *et al*, 1999), qui sont toutes deux capables de phosphoryler p53 *in vitro*.

4.3.2.1 Activation de la protéine ATM (Figure 17)

La protéine ATM est un maillon important d'une chaîne débutant à la détection de dommages causés à l'ADN et finissant à l'activation de p53. La protéine ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) est une protéine de la famille des PI₃ Kinases (Canman *et al*, 1998). La protéine ATM est capable de reconnaître de l'ADN endommagé et contient un domaine kinasique, qui lui permet de phosphoryler p53 sur sa sérine 15, l'activant ainsi.

4.3.2.2 Liaison de MDM2

Un mécanisme de stabilisation de p53 a été détaillé, dans lequel intervient MDM2. p53 est régulé par les interactions avec la protéine MDM2 (Kubbutat *et al*, 1998), qui fonctionne à la fois comme ubiquitine ligase (Honda *et al*, 1997) et comme navette permettant le transport de p53 du noyau vers le cytoplasme, où la dégradation par le protéasome aura lieu. MDM2 est elle-même régulée transcriptionnellement par p53 (Barak *et al*, 1993 ; Wu *et al*, 1993). Une augmentation de la quantité de p53 actif augmentera l'expression de MDM2, qui ciblera p53 pour la dégradation induisant ainsi une boucle de rétroaction négative (Ashcroft *et al*, 2000).

4.3.3 Conclusion

Le rôle critique de p53 dans la suppression des tumeurs a été démontré par le fait que le gène p53 est muté dans plus de 50% des cancers humains et par l'apparition précoce de cancers chez les souris p53 (-/-). Des déficiences dans le gène p53 dans la lignée germinale mènent à une tendance héréditaire à développer de nombreuses tumeurs, particulièrement dans les tissus conjonctifs. Les personnes atteintes de ces déficiences peuvent développer des tumeurs pendant l'enfance.

Etant donné le rôle crucial joué par p53 dans le contrôle de l'intégrité du patrimoine génétique, les tumeurs ont un intérêt crucial à muter p53. En effet, certaines de ces mutations permettront d'empêcher l'apoptose de certaines cellules tumorales qui présentent des anomalies importantes au niveau de l'ADN, alors que d'autres mutations empêchent le contrôle du déroulement du cycle cellulaire, permettant à ces cellules de se multiplier de façon anarchique et sans frein.

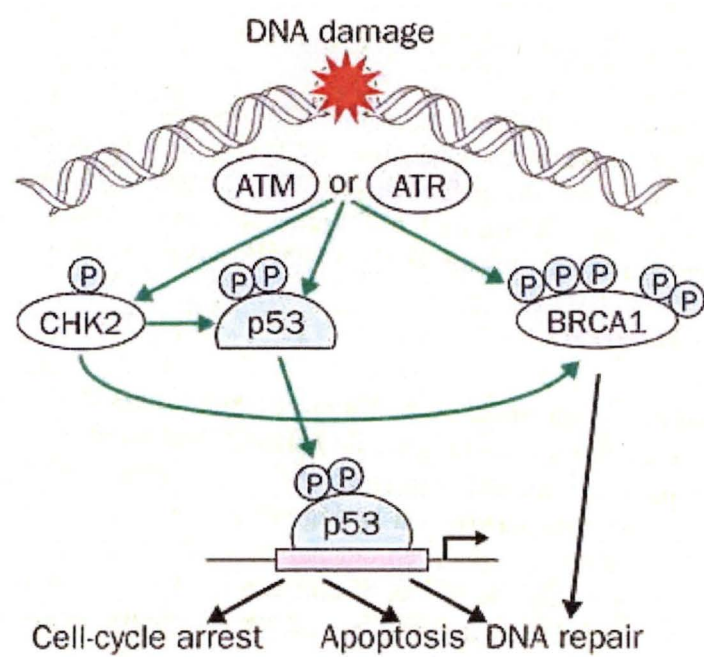


Fig.17: Représentation des mécanismes intervenant lors de l'activation de p53.

5. Résumé des interactions entre les différentes protéines étudiées

Au cours des chapitres précédents, nous avons vu que dans les cancers, alors que HIF-1 participe à la néoangiogenèse, la CK2 est souvent surexprimée et p53 est muté. L'ensemble de ces conditions permet l'approvisionnement en oxygène du centre de la tumeur dès que celle-ci a dépassé un certain volume (1mm³), la propagation de la tumeur par passage de cellules tumorales dans le sang via les vaisseaux sanguins néoformés, la survie des cellules tumorales et l'amplification d'altérations oncogéniques. Bien que ces protéines agissent séparément, des interconnexions existent. Nous allons brièvement présenter certaines d'entre elles.

5.1 Interactions entre p53 et CK2

Différentes interactions entre la CK2 et la protéine p53 ont été décrites dans la littérature. Certaines d'entre elles sont résumées ci-dessous.

La liaison de p53 à la sous-unité β régulatrice de CK2 mène à une réduction de son activité de liaison à l'ADN (Prowald *et al*, 1997). La liaison de p53 à la seule sous-unité β régulatrice suffit à inhiber la liaison à l'ADN et la fonction transactivatrice de p53 (Schuster *et al*, 1999).

CK2 s'associe au complexe CSN (Cop 9 signalosome) et phosphoryle directement p53 sur la thréonine 135, déstabilisant ainsi la protéine via un ciblage pour le protéasome (Wolf *et al*, 2003). p53 est associé à la sous-unité n°5 de l'octamère formé par CSN. CSN s'associe par ailleurs avec la Culline-based-E₃ ubiquitin ligase, à l'extrémité C-terminale de laquelle se trouve une cystéine. Cette cystéine est reconnue par la protéine NEDD-8, qui favorise l'activité E₃ ubiquitine ligase. Il est probable que CK2 inhibe CSN, de façon à l'empêcher de cliver NEDD-8 (déneddylation), ce qui permet une stimulation continue de la culline et donc une dégradation des substrats par le protéasome. Un paradoxe est présent du fait d'une contradiction entre les données biochimiques obtenues *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, CSN possède une activité inhibitrice de l'ubiquitinylation, alors que *in vivo*, CSN présente une activité activatrice de l'ubiquitinylation. Une manière de concilier ces données contradictoires est d'envisager que *in vivo*, le phénomène décrit *in vitro* s'exerce avec en plus la possibilité d'un excès de neddylation ; si un excès de protéines NEDD-8 se trouve sur le complexe Culline-based-E₃ ubiquitin ligase—CSN, le système ne fonctionne plus et le clivage par CSN de quelques-uns de ces NEDD-8 permettra de favoriser l'activité d'ubiquitinylation. Une autre hypothèse est d'envisager que l'inhibition de la culline médiée par le CSN puisse créer un environnement propice à la formation de nouveaux complexes culline—ubiquitine ligase, qui soient subséquemment activés après libération du CSN.

La protéine p53 sauvage inhibe l'activité de la CK2, tandis que lorsque p53 est muté, aucun effet sur l'activité de CK2 n'est observé (Schuster *et al*, 2001). La protéine CK2 est activée par des structures polycationiques, incluant des polyamines, *in vitro*. La spermine est une structure polycationique qui se lie à la CK2 avec une haute affinité. L'interaction entre p53 et la CK2 est fortement inhibée en présence de spermine. Ces données suggèrent l'existence d'un site de liaison commun à la spermine et à p53 sur la CK2 (Leroy *et al*, 1995). La région C-terminale de p53 est basique et ressemble à des polyamines, connues pour stimuler l'activité de CK2. Des effets similaires ont été obtenus par l'activation de la CK2 par des fragments C-terminaux de p53, mais les essais avec des protéines sauvages p53 ont montré

une inhibition de l'activité de la CK2. De plus, la portion C-terminale de p53 depuis le résidu 264 jusqu'au 393 stimule la phosphorylation de MDM2 par la CK2 (Guerra *et al*, 1997).

En conclusion, p53 est inhibé par la CK2 via la sous-unité β de cette kinase et est de plus ciblée pour la dégradation par le protéasome par une phosphorylation par la CK2. Quand p53 s'accumule, par exemple en présence de dommages à l'ADN, p53 peut alors inhiber la CK2, probablement pour lever son inhibition par cette kinase.

5.2 Interactions entre HIF et p53

p53 inhibe l'activité de HIF-1 en ciblant la sous-unité HIF-1 α pour la dégradation médiée par le protéasome. Inversement, la perte de p53 augmente l'abondance de HIF-1 α stabilisé par l'hypoxie et augmente l'expression du VEGF (gène cible de HIF-1) (Bouvet *et al*, 1998). Ce mécanisme a été notamment démontré en suivant l'exposition de lignées cellulaires p53 (-/-), qui montraient une plus grande induction de la production d'ARN messager de VEGF et de protéine correspondante que leurs homologues p53 (+/+) (Ravi *et al*, 2000). L'action de p53 sur HIF-1 se situe au niveau de la protéine proprement dite, et non pas au niveau de la transcription. En effet, la fonction transactivatrice de p53 n'est pas requise pour la suppression de l'activité de HIF-1 α et les taux d'ARN messager de HIF-1 α sont similaires dans les lignées p53(-/-) et p53(+/+). Il y a deux actions de p53 sur HIF-1 α : d'une part, le ciblage pour le protéasome via MDM2, et d'autre part, une inhibition de l'activité transcriptionnelle via une compétition pour p300.

En fait, p53 influe sur la stabilité de HIF-1 α lorsque les lignées p53 (+/+) sont mises en hypoxie ou traitées au chlorure de cobalt. La durée de demi-vie de HIF-1 est inférieure à 20 minutes, alors que la durée de demi-vie dans des cellules p53 (-/-) soumises aux mêmes traitements dépasse les 40 minutes. L'interaction entre p53 et HIF-1 α conduit au ciblage de HIF-1 α par MDM2 pour l'ubiquitinylation et de ce fait, stabilise en parallèle p53 car p53 n'est alors plus reconnu par MDM2. On observe alors une augmentation de la quantité de p53 en hypoxie sévère (Constantillos *et al*, 2001).

p53 se lie à p300 au niveau d'un site localisé entre les acides aminés 1514 et 1922, tandis que HIF-1 se lie à p300 au niveau des résidus 346-410. En parallèle à la régulation de la stabilité des deux protéines, on observe également une régulation réciproque de deux activités transcriptionnelles. On observe ainsi une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et une augmentation de celle de p53, car il y a compétition entre p53 et HIF-1 pour la liaison aux coactivateurs avec un effet dominant de p53.

En conclusion, p53 inhibe HIF-1 en le ciblant pour le protéasome par MDM2, ce qui conduit en parallèle à une stabilisation de p53. Un effet similaire est observé pour l'activité transcriptionnelle des deux facteurs via une compétition pour le co-activateur p300. Cette double inhibition de HIF-1 est observée en conditions d'hypoxie sévère (Piret *et al*, 2002).

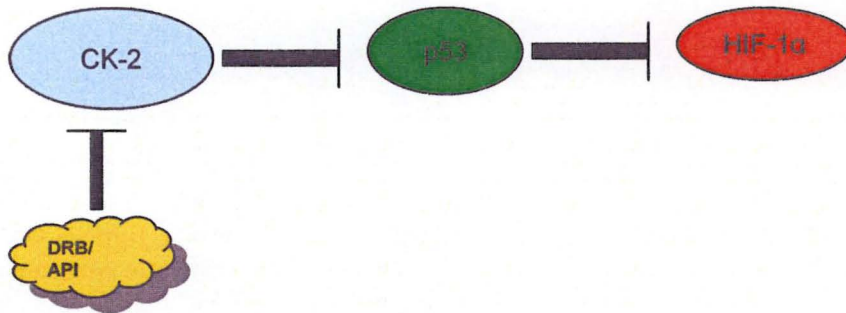


Fig.18 : Représentation schématique de la double inhibition : CK2 inhibe p53, qui inhibe lui-même HIF-1. Ceci résulte en une activation de HIF-1 par la CK2. Si la CK2 est inhibée, l'inhibition de p53 est levée et l'activité de HIF-1 diminue.

Objectifs du mémoire

Les protéines HIF-1, p53 et CK2 jouent toutes les trois un rôle dans la survie des cellules cancéreuses et le développement des tumeurs. Les résultats de la littérature montrent des interactions entre CK2 et p53 d'une part, et entre p53 et HIF-1 d'autre part. En effet, il a été démontré que la CK2 inhibe p53, principalement en diminuant sa stabilité et que p53 inhibe HIF-1. Au laboratoire, Denis Mottet a montré que des inhibiteurs agissant sur la protéine CK2 inhibent l'activité transcriptionnelle de HIF-1, mais le mécanisme de cet effet n'est pas connu. Nous avons, sur base des données citées ci-dessus, proposé une hypothèse (Figure 18) : est-il possible que l'effet des inhibiteurs de la CK2 se répercute sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 via p53, c'est-à-dire est-il possible de considérer une hypothèse de double inhibition : comme la CK2 inhibe p53, lorsque celle-ci est inhibée, p53 s'accumulerait et inhiberait l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Le travail présenté dans ce mémoire a pour but de répondre à cette question, cruciale pour une meilleure compréhension des interactions entre ces trois protéines.

Ce travail se divise en deux grandes parties. Dans la première partie, nous avons étudié les effets de deux inhibiteurs de la CK2 sur la quantité, la liaison à l'ADN et l'activité de HIF-1 et de p53 afin de mettre en parallèle les effets observés. La deuxième partie du travail porte sur la mise en évidence d'une interaction directe éventuelle entre les deux protéines que sont HIF-1 et p53. Premièrement, nous avons étudié l'effet d'une augmentation et d'une diminution de l'activité de p53, sur l'abondance de HIF-1 α et l'activité de HIF-1. Deux approches ont ensuite été utilisées pour mettre en évidence une interaction entre les deux protéines : un test trans-AM modifié dans lequel un des deux facteurs est lié à sa séquence consensus au niveau de l'ADN et une coimmunoprécipitation.

Les deux inhibiteurs de la CK2 que nous avons employés sont le DRB ou 5, 6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (Critchfield *et al*, 1997 ; Hjerrild *et al*, 2001) et l'apigénine (Ford *et al*, 2000 ; Song *et al*, 2000 ; Shen *et al*, 2001). Ils sont décrits comme étant des inhibiteurs spécifiques. Deux types cellulaires ont été utilisés : les cellules HepG2 dans lesquelles l'activité de HIF-1 et sa régulation en hypoxie sont bien connues et les cellules HeLa qui présentent l'avantage de permettre la réalisation d'extraits nucléaires, nécessaires aux tests de liaison à l'ADN des facteurs de transcription. Ces deux types cellulaires contiennent la protéine p53 sauvage.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ce mémoire devraient nous permettre de mieux comprendre comment la CK2 régule l'activité de HIF-1 en hypoxie et de déterminer le rôle que p53 joue dans ce mécanisme.

**Matériel
et
Méthodes**

Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1 Lignées cellulaires

- HepG2 : Il s'agit de cellules d'hépatome humain.
- Hep3B : Il s'agit de cellules d'hépatome humain, qui n'ont plus le gène codant pour p53.
- HeLa : Il s'agit des cellules immortelles qui sont des cellules provenant d'un carcinome du col de l'utérus.

1.2 Matériel

1.2.1 Supports

- T75, Costar, n° 3375, Corning, NY, USA.
- T25, Costar, n°403168, NY, USA.
- Boîte 24 puits Costar, n°3524, NY, USA.
- Tubes de 10 ml Sarstedt.
- Canon de pipettes pasteur Bilbate préalablement stérilisées à l'autoclave.

1.2.2 Milieux

- DMEM Gibco (Dulbecco modified Eagle's Medium), auquel sont ajoutés des antibiotiques (streptomycine/pénicilline) et de fongizone. Ce milieu est enrichi de 10% de sérum de veau fœtal et utilisé pour la culture de cellules HepG2.
- DHG Gibco (DMEM High Glucose).
Ce milieu est enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, UK), et est utilisé pour la culture de cellules HeLa.
- RPMI 1640, Gibco, auquel sont ajoutés un couple d'antibiotiques (streptomycine/pénicilline). Ce milieu est enrichi de 10% de sérum de veau fœtal et utilisé pour la culture de cellules Hep3B.
- Trypsine-EDTA : Solution de trypsine à 0,5 g/l et EDTA à 0,2 g/l préparée dans une solution de Puck (Gibco, Paisley, UK).
- Solution stérile de PBS.

- Pénicilline G : 50 U/ml (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgique).
- Streptomycine : 50 µg/ml (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgique).
- Anti-fongique : Amphotéricine B 250 µg/ml (Gibco, Paisley, UK).

1.2.3 Méthode

1.2.3.1 Préparatifs

Les milieux utilisés sont préchauffés à 37°C et les précautions d'usage en matière de stérilité sont prises.

Tableau 1 : Préparation des milieux CO₂ indépendants avec les inhibiteurs

Milieus+inhibiteurs	Pour 8 ml (2 boîtes T25 à 4 ml/boîte)	Pour 20 ml (2 boîtes T75 à 10 ml/boîte)	Pour 6 ml (2X3 puits à 1 ml/ puits dans 1 boîte 24 puits)
DRB 100 mM Stock : 10 µM	80 µl de DRB stock	200 µl de DRB stock	60µl DRB stock
DRB 50 mM Stock : 10 µM	40 µl	100 µl	30 µl
DRB 25 mM Stock : 10 µM	20 µl	50 µl	15 µl
API 40 mM Stock : 0,1 M	3,2 µl d'API stock	8,4 µl d'API stock	2,4 µl d'API stock
API 20 mM Stock : 0,1 M	1,6 µl	4,2 µl	1,2 µl
API 10 mM Stock : 0,1 M	0,8 µl	2,1 µl	0,6 µl
Pif 20 mM Stock : 0,1 M	2,4 µl Pif stock	6 µl Pif Stock	1,8 µl de Pif stock
Pif 10 mM Stock : 0,1 M	6 µl	3 µl	0,9 µl

Tableau 2 : Plasmides utilisés pour les systèmes rapporteur.

Plasmides	Références
pRL/SV40	Promega, USA
pGL3-6HRE	Promega, USA
pMyc-CMV	Clontech
p53wt-CMV	Promega, USA
pGL3-p53RE	Promega, USA

1.2.3.2 Manipulation proprement dite

Le milieu est décanté et les cellules sont rincées avec 5 ml de milieu de rinçage (PBS stérile). 2 ml de solution trypsine + EDTA sont ensuite ajoutés. Lorsque les cellules commencent à se détacher, on ajoute 5 ml de milieu + sérum 10%, de façon à stopper les effets de la trypsine + EDTA. La suspension cellulaire est prélevée, transférée dans un tube de 10 ml et centrifugée à 1000 rpm, durant 4 minutes. On resuspend le culot dans 10 ml de milieu + sérum. On distribue ensuite la solution cellulaire dans de nouvelles boîtes selon la densité désirée.

2. Incubation en hypoxie

2.1 Matériel

2.1.1 Milieu

- Milieu CO₂ independant (Gibco) auquel 36 mg de Glutamine (Sigma, G8450) sont ajoutés pour 500 ml. On ajoute à ce milieu de la fongizone et des antibiotiques (streptomycine/pénicilline).

2.1.2 Inhibiteurs

- DRB: 5, 6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole, Cat n° EI-231, Biomol Research Laboratories Inc, USA.
- Apigénine: Sigma A3145.
- Pifithrine: Pifithrine-α . hydrobromide, Alexis Biochemicals, n° A 3145.

2.2 Méthode

Les solutions sont préparées extemporanément comme indiqué sur le tableau 1.

Lors des expériences en conditions hypoxiques, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu CO₂ indépendant contenant les différents inhibiteurs : 1 ml/puits pour les plaques 24 puits, 4 ml et 10 ml pour les T25 et T75 respectivement. Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur à 37°C (99% d'azote et 1% d'oxygène). Des boîtes contrôles sont incubées dans les mêmes conditions, mais en normoxie (atmosphère normale).

3. Transfection

3.1 Matériel

- Boîte 24 puits Costar, n°3524, NY, USA.
- DMEM Gibco (Dulbecco modified Eagle's Medium), avec ou sans 10% de sérum foetal de veau.
- Superfect : Qiagen, USA.
- Plasmides (tableau 2).
- PBS stérile.

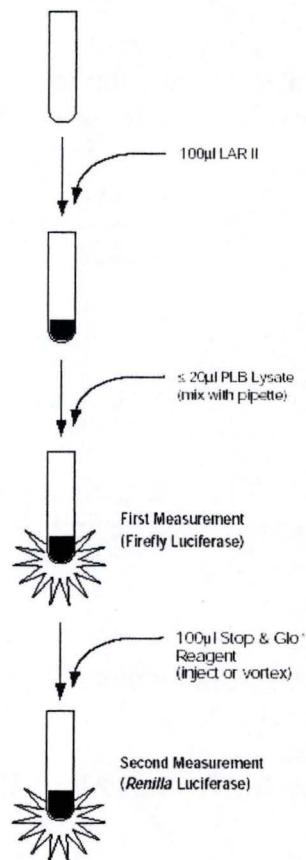


Figure 1 : Principe de fonctionnement du kit Dual-Luciferase.

Tableau 3 : Préparation des tampons pour révéler les systèmes rapporteurs.

Tampons	Préparation
Tampon de lyse (PBL)	-diluer 5X dans de l'eau distillée. -100µl/puits
Tampon+Substrat 1 (FirL)	-Bouteille de poudre lyophilisée à resuspendre dans 10 ml de solution tampon (Fiole verte).
Tampon+Substrat 2 (RenL)	-Solution à diluer 50X dans une solution tampon (Fiole bleue).

3.2 Méthode

Préparer les solutions plasmidiques, sachant qu'il faut 1,5 µg d'ADN par puits, que de ces 1,5 µg, 10/13 sont constitués d'ADN carrier (pMyc, p53 wt/pCMV), 1/13 de plasmide normalisateur (pRL) et 2/13 d'ADN test (pGL3 vide, pGL3-p6HRE ou pGL3-p53RE). Ces solutions préparées, on ajoute les quantités requises de PBS stérile, en sachant que le volume final de solution (plasmides + PBS) doit être de 15 µl par puits. Ajouter ensuite 3 µl de Superfect par puits et attendre 10 à 15 minutes, le temps que les complexes se forment. Ajouter du DMEM sans sérum, en sachant qu'on remplit chaque puits avec 1 ml. Les boîtes sont décantées et rincées au PBS stérile. Les puits sont redécantés et on y ajoute 1 ml de solution plasmides + Superfect + DMEM. On laisse incuber en étuve 37°C, 5% de CO₂ durant 3 heures. On redécante, on ajoute 1 ml de DMEM + sérum 10% par puits et on laisse reposer durant 4 heures.

4. Système rapporteur (Figure 1)

4.1 Principe de la méthode

Un système rapporteur sert à mesurer l'activité transcriptionnelle d'un facteur de transcription, en suivant l'expression d'un gène rapporteur dont la transcription est sous la dépendance de séquences consensus reconnues par ce facteur. Ce test utilise 2 luciférase d'organismes différents, ce qui permet à la fois une quantification (Firefly ou *Photynus pyralis*) et une normalisation de la variabilité d'efficacité de transcription de puits à puits (Renilla ou *Renilla reniformis*). L'activité de ces deux luciférase est mesurée de façon séquentielle à partir du même échantillon. Deux émissions de lumière seront quantifiées par le luminomètre.

4.2 Méthode

Les tampons sont préparés à partir du kit Dual-Luciférase (Proméga) comme indiqué dans le tableau 3. Les puits contenant les cellules sont décantés à la pipette pasteur. Dans chaque puits sont ajoutés 100 µl de tampon PLB (passive lysis buffer) et les plaques sont disposées sur l'agitateur durant 15 minutes afin de lyser les cellules. On prélève 10 µl de chaque lysat, que l'on ajoute aux 100 µl de substrat firefly avant de procéder à une première lecture. Après cette première lecture, on ajoute 100 µl de substrat Renilla (Stop & Glo) et on procède à une seconde lecture. Les résultats sont exprimés en tant que rapports de l'activité de la luciférase Firefly sur l'activité de la luciférase Renilla.

5. Immunofluorescence

5.1 Principe de la méthode

Le but de cette manipulation est de localiser une protéine d'intérêt *in vivo*, au niveau cellulaire, au moyen d'un marquage réalisé à l'aide d'anticorps primaires reconnaissant spécifiquement cette protéine, lesquels sont reconnus dans un deuxième temps par des anticorps secondaires anti-immunoglobuline, couplés à un fluorochrome.

5.2 Matériel

5.2.1 Supports

- Plaques de 24 puits (Costar, Corning, NY, USA).
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Knittel Glaser, Allemagne).
- Boîte en verre de forme circulaire, avec couvercle adapté.
- Parafilm de grande et de petite taille, Pechiney Plasic packaging, USA.
- Papier Whatman.
- Lame porte-objet « Superfrost » de 2,6 X 7,6 cm, Vel, Allemagne.
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne-Angleterre) : milieu de montage.

5.2.2 Solutions

- PBS : Pour 1 litre : 20 ml de tampon PO_4 0,5 M + 9 g de NaCl, porter à pH 7,4.
- PBS+BSA 2% (BSA, Sigma, USA).
- PBS+Triton X-100 1% (Triton X-100, Merck, Allemagne).
- PBS+PFA 4% (Paraformaldéhyde, Darmstadt, Allemagne).

5.2.3 Anticorps et marqueur nucléaire

- HIF-1 α souris (BD Bioscience Transduction Laboratories, USA, n°610958) dilué 100X dans du PBS + BSA.
- p53 souris (Upstate Biotech, USA, n°05224) dilué 100X dans du PBS + BSA.
- TOPRO-3 (Molecular Probe) dilué 80X dans une solution de RNase à 2 $\mu\text{g/ml}$ de PBS.

5.3 Méthode

Après avoir été repiquées dans des boîtes 24 puits contenant des lamelles porte-objet, à raison de 50000 cellules par puits, les cellules sont incubées en présence de milieu+sérum 10% dans une étuve à 95% d'humidité et à 5% de CO_2 . Elles seront ensuite incubées 5 heures en hypoxie ou en normoxie, après changement de milieu par du milieu CO_2 indépendant, auquel ont été rajoutés les inhibiteurs. A la fin de l'incubation, le milieu est délicatement décanté.

Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de paraformaldéhyde 4% durant 10 minutes et sont immédiatement rincées 3X au PBS à température ambiante. L'étape suivante est la perméabilisation des cellules à l'aide de PBS + Triton 1% durant 5 minutes. On rince ensuite avec du PBS+BSA 2% 3X 5 minutes. Durant le troisième rinçage, la chambre humide sera construite. Le papier Whatman est découpé selon la forme et la taille de la boîte circulaire, ce papier est ensuite déposé au fond de la boîte où il est humidifié à l'aide d'eau distillée. Un tube sera utilisé comme rouleau pour aplanir le Whatman. Deux larges bandes de parafilm sont ensuite adaptées à la boîte et sont numérotées de façon à ordonner les couvre-objets des boîtes 24 puits. Les anticorps primaires dilués 100X dans du PBS+BSA 2% sont ensuite déposés, à raison de gouttes de 30 μl , face aux numéros de la chambre humide. A l'issue des trois rinçages PBS+BSA, les lamelles couvre-objet sont récupérées délicatement. Les lamelles sont déposées face cellulaire sur les gouttes d'anticorps primaire. La boîte ronde est ensuite scellée à l'aide de parafilm et mise à 4°C pour la nuit. Le lendemain, on commence par vider les boîtes et par ajouter 1ml de PBS par puits. Les lamelles sont ensuite récupérées et plongées dans le PBS, dans les puits correspondant aux numéros. On procède à 2 autres rinçages avec du PBS. Durant le troisième rinçage, on change le parafilm de la chambre humide que l'on numérote et on place 30 μl d'anticorps secondaire dilué 500X dans du PBS+BSA. On laisse incubé de 45

Tableau 4 : Tampon de lyse utilisé pour obtenir un lysat cellulaire total.

Préparation du tampon de lyse	Condition
<p>Pour 4 ml :</p> <p>-Tampon de lyse 2X : 2 ml.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tris 40 mM pH 7.5 (Merck, Germany) • KCl 150 mM (Merck, Germany) • EDTA 1 mM (Merck, Germany) <p>-Eau distillée : 1160 μl.</p> <p>-Triton X-100 : 40 μl.</p> <p>-PIC : (400 μl) Inhibiteurs de phosphatases 1x à partir d'un stock 25x</p> <ul style="list-style-type: none"> • NaVO₃ 25 mM (Sigma, USA) • PNPP (phospho-nitrophényl phosphate) 250 mM • α-glycérophosphate 250 mM (Sigma, USA) • NaF 125 mM (Merck, Germany) <p>-PIB : (400 μl) Inhibiteurs de protéases 1x (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x, Roche, Germany)</p>	<p>-Température ambiante.</p> <p>-Sur glace, à 4°C.</p>

à 60 minutes à l'abri de la lumière. Après cette incubation, on procède à un marquage au TOPRO-3, à raison de 30 µl par lamelle, sur un parafilm neuf dûment annoté et placé dans la chambre humide. L'incubation dure ici 30 minutes. Après trois rinçages au PBS, l'étape finale est le montage des lamelles sur lame : 2 gouttes de mowiol préchauffé à 56°C par lame, sur lesquelles 2 lamelles seront déposées. Le tout est placé dans l'obscurité pour ne pas endommager les fluorochromes et en chambre froide. Finalement, le lendemain, les lames sont observables au microscope confocal (Leica, Heidelberg, Allemagne).

6. Western Blot

Cette technique a pour but de quantifier l'abondance d'une protéine d'intérêt dans un lysat cellulaire. Pour cela, on sépare les protéines du lysat cellulaire en fonction de leur poids moléculaire, en les déposant sur un gel dont la réticulation est fonction de la taille des protéines à observer et en soumettant ce gel à une différence de potentiel constante. Ce gel est ensuite déposé dans un « sandwich » constitué d'une succession d'éponges et de papiers Whatman humidifiés, disposés de part et d'autre d'une membrane de polyvinylidène fluoride déposée au dessus du gel, de façon à transférer les protéines dessus. La membrane sera ensuite récupérée et utilisée comme support pour le marquage à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine à détecter.

6.1 Lysat cellulaire total

6.1.1 Matériel

- Tampon de lyse (Tableau 4) à 4 °C.
- Eppendorfs sur glace.
- Cellscraper, TTP, Switzerland.

6.1.2 Méthode

Les boîtes de cellules sont déposées sur glace et bien décantées. Le tampon de lyse est ajouté (200 µl pour les T25 et 1 ml pour les T75) en arrosant bien tout le tapis cellulaire. Les cellules sont ensuite raclées avec le Cellscraper™ et le lysat résultant est transféré dans les eppendorfs sur glace où il est directement homogénéisé à la pipette. Les lysats obtenus sont centrifugés à 13000 rpm, à 4°C, pendant 5 minutes. On aliquote dans 3 tubes eppendorfs sur glace : 2 contenant 100 µl chacun et 1 contenant 10-15 µl destiné au dosage des protéines. Ces échantillons sont stockés immédiatement à -70°C.

6.2 Méthode de Bradford

6.2.1 But de la méthode

Le but de cette méthode est d'estimer la quantité de protéines totale dans chaque échantillon, afin de pouvoir charger des quantités équivalentes de protéines sur le gel du western blot.

6.2.2 Matériel

- Colorant Bio-Rad Protein Assay 5X (Bio-Rad, Richmond, USA)
- Etalon BSA 2 ug/ul (Bovine Serum Albumin).

Tableau 5 : Formule permettant d'estimer la quantité de protéines (µg) par µl de solution.

$$\frac{(\text{Etalon} - \text{Blanc étalon})}{(\text{Echantillon} - \text{Blanc échantillon})} \times \frac{5}{\text{Vol éch chargé}} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Tableau 6 : Solutions utilisées pour Western-Blot.

A) Méthode 1 : HIF-1α, p53 et α-tubuline.

Solutions	Références	Préparation
Tampon MES (p21) Tampon MOPS	MES SDS running buffer (20X), 500ml.	Pour 1 litre: -50 ml de MOPS. -950 ml d'H ₂ O. 200 ml sont additionnés de 200 µl d'antioxydant et 800 ml sont utilisés tels quels.
	MOPS SDS running buffer (20X), 500ml.	Pour 1 litre: -50 ml de MOPS. -950 ml d'H ₂ O. 200 ml sont additionnés de 200 µl d'antioxydant et 800 ml sont utilisés tels quels.
Tampon de transfert	-Méthanol 100%, Merck, Allemagne.	Pour 200 ml : -40 ml de méthanol. -10 ml de Nu-PAGE. transfert Buffer -200 µl d'antioxydant -150 ml d'H ₂ O.
Tampon de révélation	-Gloria : lait écrémé, Nestlé. -TBS 1X 0,1% Tween.	-TBS 1X 0,1% Tween : NaCl: 2 ,42 g. Tris : 8 g. Tween : 1 ml. pH 7.6. 800 ml sont additionnés de 40 g de gloria (5% final) et 200 ml sont utilisés tels quels.

- Spectrophotomètre Ultraspec 2100 pro UV/visible spectrophotometer, réglé sur 595nm.

6.2.3 Méthode

Un ml de solution Bradford 1X est placée dans chaque tube. Les aliquots des échantillons sont décongelés (10-15 µl). Ajouter le nombre de µl correspondant à l'échantillon (3 ou 5 µl), à l'étalon (3,5 µl) et aux blancs correspondants de 30 secondes en 30 secondes ou de minute en minute et vortexer. Attendre 5 minutes avant de commencer les lectures au spectrophotomètre. Le calcul qui permet d'obtenir une concentration en protéines est présenté au tableau 5.

6.3 Electrophorèse et révélation

6.3.1 Matériel

Cette technique nécessite plusieurs étapes :

1. Séparation des protéines selon leur poids moléculaire par une électrophorèse sur gel NU-PAGE™.
2. Transfert des protéines sur une membrane.
3. Détection de la protéine d'intérêt par marquage indirect au moyen d'anticorps primaire reconnaissant la protéine et d'anticorps secondaire anti-immunoglobuline couplé à un système de révélation (peroxydase).
4. Révélation par chimoluminescence.

6.3.2 Supports

6.3.2.1 Gels, membrane de transfert, et appareillage

- Nu-Page 4-12% Bis-tris gel, 1,5mm X10 wells, NP00335.
- Nu-Page 4-12% Bis-tris gel, 1,0mm X15 wells, NP0323.
- Nu-Page 10% Bis-tris gel, 1,5mm X10 wells, NP0315.
- Nu-Page 10% Bis-tris gel, 1,0mm X15 wells, NP0303.
- Hybond P, membrane de polyvinylidène fluoride, Amersham Bioscience.
- Pharmacia Biotech, Electrophoresis Power Supply, EPS 3500 XC.

6.3.2.2 Solutions

(Tableau 6)

6.3.3 Anticorps

6.3.3.1 Anticorps primaires

- Anti-p53 souris, Upstate Biotech, USA, N°05224.
- Anti-HIF-1α souris, BD Transduction Laboratories, USA, N°610958.
- Anti-p21 souris, Santa Cruz, USA, SC6246.
- Anti-α-tubuline souris, Sigma, USA, T5168.

6.3.3.2 Anticorps secondaire

- Anti-mouse Ig, Horseradish peroxydase, Amersham Bioscience, NO931V.

		quels.
--	--	--------

Tableau 6 (suite).

B) Méthode 2 : p21.

Idem, sauf en ce qui concerne les tampons de révélation.

Solutions	Références	Préparation
Tampon de révélation	-TBS 1X 0,1% Tween. -Kit ECL Advance Western blotting detection, blocking reagent. Amersham, USA	-TBS 1X 0,1% Tween : NaCl: 2 ,42g Tris : 8 g Tween : 1 ml Porter à1 litre et à pH 7.6. 800 ml sont utilisés tels quels et 200 ml sont additionnés de 6 g d’agent bloquant (3% final).

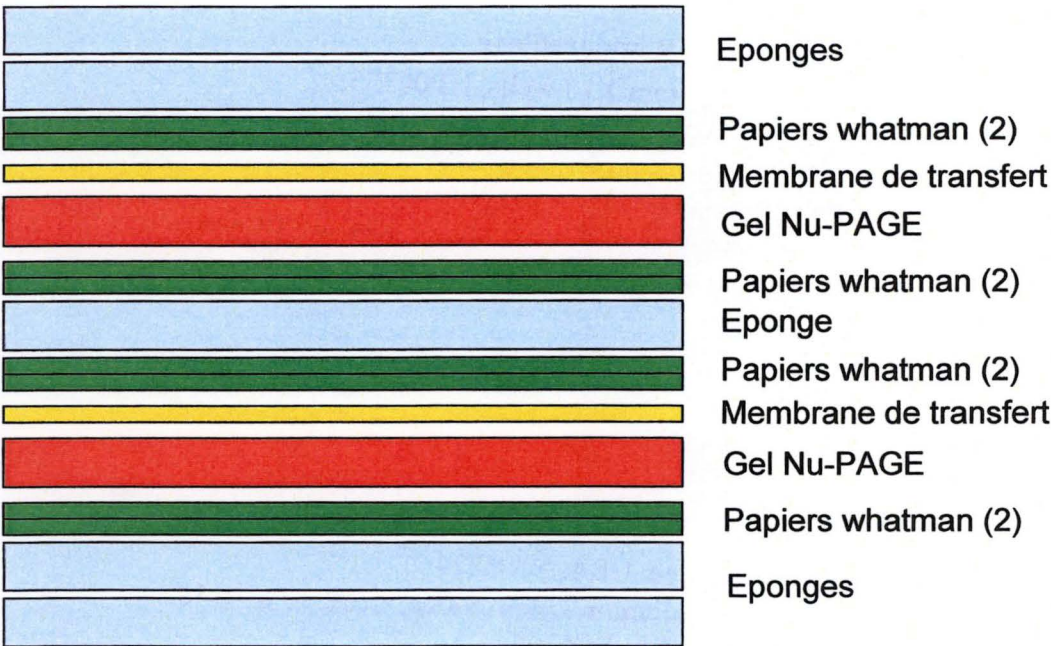


Figure 2 : Disposition des différentes couches du sandwich réalisé pour le transfert des protéines du gel d’électrophorèse sur la membrane.

6.3.4 Méthodes

6.3.4.1 Migration par électrophorèse

La cuve d'électrophorèse est montée de façon à ce que les gels soient orientés pour que les puits soient face au compartiment central. Le gel est déballé, les peignes fermant les puits sont retirés délicatement, les puits sont rincés avec du tampon MOPS ou MES et la languette du bas du gel est retirée. Le compartiment central est rempli de MOPS/MES + antioxydant, tandis que les compartiments latéraux sont remplis de MOPS ou de MES seuls. Les échantillons sont préparés : des eppendorfs sont annotés, dans lesquels on dépose 9 µl de bleu + 1 µl de DTT 0,5M, avant d'y ajouter les échantillons, et les tubes sont mis sur bloc chauffant à 70°C, durant 15 minutes. On charge le gel de façon asymétrique, en commençant par l'étalon (7 µl), à l'aide de tips fins. La migration se réalise à 200 volts, pendant 50 minutes. Durant la migration, la solution de transfert sera préparée (Tableau 6), ainsi que les membranes (1 par gel) et les papiers whatman (8 par gel) selon des dimensions de 8,5 X 7 cm. Les membranes seront maniées avec des gants et seront imbibées avec du méthanol, avant d'être plongées dans la solution de transfert. Après 50 minutes de migration, le générateur est stoppé et le gel est démoulé. Le gel est découpé au niveau des puits et en bas pour avoir une surface plane pour poser la membrane.

6.3.4.2 Transfert

Pour le transfert, un sarcophage spécial est utilisé, dans lequel est construit un « sandwich » représenté à la figure 2. Il est nécessaire de faire attention que des bulles ne viennent pas se loger entre la membrane et le gel. Le sarcophage est refermé avec soin et réinséré dans la cuve. Le tampon de transfert est déposé dans l'ouverture supérieure du sarcophage et les compartiments latéraux sont remplis d'eau distillée. Le transfert dure 2h30 à 30 volts et 400mA.

6.3.4.3 Détection

Le tampon de révélation TBS + Tween 0,1% est préparé (Tableau 6). Les membranes sont récupérées du sarcophage et sont déposées dans des récipients contenant du TBST + Gloria 5%, face côté gel vers l'intérieur, qui sont mis à tourner sur un « roller » à 4°C pour la nuit. Les anticorps primaires sont dilués 5000 fois (méthode 1) ou 10000 fois (méthode 2) dans 5 ml de solution de TBST + agent bloquant par membrane. Les membranes sont incubées pendant 2h00 en présence des solutions d'anticorps à température ambiante. Après l'incubation, on procède à 3 lavages de 15 minutes chacun avec du TBST + Gloria 5% (méthode 1) ou avec du TBST seul (méthode 2). L'anticorps secondaire est dilué 50000X (méthode 1) ou 200000X (méthode 2) dans 50 ml par membrane. On dépose alors l'anticorps secondaire sur les membranes ayant reçu l'anticorps primaire correspondant et on laisse incuber 45 minutes à RT. Les membranes sont alors lavées 2X 15 minutes avec du TBST + Gloria 5% (méthode 1) ou du TBST seul (méthode 2), et 2X 5 minutes avec du TBST seul.

6.3.4.4 Révélation

Durant le dernier lavage de 5 minutes, on prépare une farde contenant 2 chemises plastiques disposées en livre, une plaque en verre propre sur laquelle on déposera la membrane et la solution de révélation à partir des solutions A et B (Kit ECL Advance western blotting detection, Amersham) en quantités identiques (2 ml/membrane). On sort la membrane de sa bouteille en ne touchant pas la surface tournée vers l'intérieur, et on la dépose sur la plaque de verre. On verse la solution de révélation sur la membrane et on

Tableau 7 : Tampons de lyse employés pour la CoIP.

Tampon de lyse 1	Tampon de lyse 2
-15 ml de lyse stock 2X (Voir tableau 6). -8,7 ml d'eau distillée. -300µl de triton X-100. -3 ml de PIC. -3 ml de PIB.	Pour 100 ml : -Tris : 0,3031g. -NaCl : 0,6 g. -EDTA : 0,372 g. -Glycérol 87% : 10 ml, Merck, Germany. -Nonidet P-40 : 200µl, Merck, Germany. A rajouter au moment même, dans 30 ml : -PIC : 3 ml. -PIB : 3 ml. -DTT 0,1 M : 300 µl.

Tableau 8:Anticorps utilisés pour la CoIP.

Anticorps	Méthode 1	Méthode 2
Ac primaire anti-HIF-1α (BD Transduction Laboratories, USA).	Western, dilution 5000 X.	Western, dilution 5000 X.
Ac primaire anti-p53 mouse (Upstate Biotech, USA) n° 05224.	Western, dilution 5000 X.	Western, dilution 5000 X.
Ac primaire anti-p53 rabbit (Santa Cruz, USA) SC 6243.		12,5 µl par test.
Ac secondaire anti-mouse (Amersham Bioscience, USA) NO931V.	Western, dilution 50000 X.	Western, dilution 50000 X.

laisse agir 5 minutes. Après 5 minutes, on égoutte la membrane et on la dépose dans la farde, entre les chemises plastiques, que l'on referme en faisant attention aux bulles. L'étape finale consiste à révéler en chambre noire. On dépose un film photo sur la feuille plastique supérieure de la farde durant un temps déterminé. Au bout de ce laps de temps, le film est plongé dans une solution de révélation jusqu'à ce qu'apparaissent les bandes, puis dans un bac d'eau (qui stoppe la première réaction) et enfin dans un fixateur durant 5 minutes. Lorsque la fixation est correcte, le film est finalement rincé abondamment à l'eau de ville et mis à sécher.

7. Coimmunoprécipitation

7.1 But de la méthode

Une expérience de coimmunoprécipitation est réalisée dans le but de mettre en évidence de l'association de deux protéines. En capturant un des acteurs à l'aide d'anticorps spécifiques, on espère capturer l'autre, ce que l'on tente de mettre en évidence par western blot. On peut choisir de surexprimer l'un des acteurs par transfection avant de réaliser la coimmunoprécipitation proprement dite.

7.2 Matériel

- Boîtes de cellules.
- Cellscrapers, TPP, Switzerland, n°99003.
- Glycine 87% Merck, Allemagne.
- PIC (protease inhibitor cocktail) et PIB (phosphatase inhibitor buffer) (composition: voir tableau 4).
- Triton X100, Merck, Allemagne.
- Inhibiteur du protéasome MG 132, 40 mM dans du DMSO, Biomol, PI-102.
- Tampon de lyse (Tableau 7).
- Billes c-Myc monoclonal Ab Agarose BD #631208.
- Billes ProteinG PLUS/ Protein A-Agarose, Oncogene™ Research products n° IP10.
- Anticorps (Tableau 8).

7.3 Méthodes

Méthode 1	Méthode 2
1. HIF-1 α wt-Myc surexprimé.	1. Préparer tampon de lyse 1 ou 2.
2. Préparer tampon de lyse 1.	2. Racler dans 1 ml de tampon de lyse.
3. Racler dans 1 ml de tampon de lyse	3. Centrifuger seulement si utilisation du tampon de lyse 1.
4. Centrifuger durant 4 min à 13000rpm, à 4°C.	4. Prélever 50 μ l de surnageant et garder à -70°C.
5. Prélever 50 μ l de surnageant et garder à -70°C.	5. Mettre le reste du surnageant dans un nouvel eppendorf sur glace si tampon de lyse 1.
6. Mettre le reste du surnageant dans un nouvel eppendorf sur glace.	6. Rajouter 50 μ l d'inhibiteur du protéasome MG132.

Tableau 9 : Solutions pour la réalisation d'extraits nucléaires dont les solutions sont maintenues à 4°C.

Solutions	Méthode 1	Méthode 2
HB 10X	-200 mM HEPES (Acros Organics). -50 mM NaF (Merck, Allemagne). -10 mM Na ₂ MoO ₄ (Sigma, USA). -1 mM EDTA (Merck, Allemagne). -pH 7.9.	-200 mM HEPES (Acros Organics). -50 mM NaF (Merck, Allemagne). -10 mM Na ₂ MoO ₄ (Sigma, USA). -1 mM EDTA (Merck, Allemagne). -pH 7.9.
Tampon de lyse (pour 100ml)	-10 ml HB 10X. -200 µl NP-40. -70 ml d'H ₂ O.	-10 ml HB 10X. -200 µl NP-40. -70 ml d'H ₂ O.
RE (pour 100ml)	-10 ml HB 10X. -20 ml glycérol 87%. -70 ml d'H ₂ O.	-10 ml HB 10X. -20 ml glycérol 87%. -70 ml d'H ₂ O.
SA (pour 100 ml)	-10 ml de HB 10X. -20 ml de glycérol 87%. -20 ml de NaCl 4 M (7,01 g/30 ml d'H ₂ O). -50 ml d'H ₂ O.	-10 ml de HB 10X. -20 ml de glycérol 87%. -20 ml de NaCl 4 M (7,01 g/30 ml d'H ₂ O). -50 ml d'H ₂ O.
RE (pour 1ml)	-1 ml de RE. -40 µl de PIC. (Tableau 4) -40 µl de PIB.	-1 ml de RE. -40 µl de PIC. (Tableau 4) -40 µl de PIB.
SA (pour 1 ml)	-375 µl de SA. -625 µl de RE. -40 µl de PIC. -40 µl de PIB.	-1 ml de SA. -40 µl de PIC. -40 µl de PIB.
PBS froid+ inhibiteurs de phosphatase (5ml)	Pour 1litre de PBS : -20 ml de tampon PO ₄ . -9 g de NaCl. -pH 7.5. Pour 5ml de PBS froid : Ajouter 1,2 mg de Na ₂ MoO ₄ et 1,26 mg de NaF.	Pour 1litre de PBS : -20 ml de tampon PO ₄ . -9 g de NaCl. -pH 7.5. Pour 5ml de PBS froid : Ajouter 1,2 mg de Na ₂ MoO ₄ et 1,26 mg de NaF.

Matériel et Méthodes

7. Rajouter 50 µl de billes c-Myc.	7. Ajout de l'Anticorps anti-p53 de lapin SC6243 (12,5 µl/test).
	8. Tourner 2h sur roue à 4°C.
8. Tourner 2h sur roue à 4°C.	9. Rajouter 50 µl de billes protG/A.
9. Centrifuger 2 min à 13000 rpm, 4°C.*	10. Tourner 2h sur roue à 4°C.
10. Décanner le surnageant.*	11. Centrifuger 2 min à 13000 rpm, 4°C.*
11. Rajouter 800 µl de tampon de lyse par test.*	12. Décanner le surnageant.*
12. Tourner 15 minutes sur roue à 4°C.*	13. Rajouter 800 µl de tampon de lyse par test.*
13. Centrifuger 5 min à 13000 rpm, 4°C.	14. Tourner 15 minutes sur roue à 4°C.*
14. Décanner et resuspendre le culot dans 20 µl de tampon de charge pour SDS-PAGE (Bleu 2/5 X).	15. Centrifuger 5 min à 13000 rpm, 4°C.
15. Incuber 5 minutes à 100°C.	16. Décanner et resuspendre le culot dans 20 µl de tampon de charge pour SDS-PAGE (Bleu 2/5 X).
16. Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm, RT.	17. Incuber 5 minutes à 100°C.
17. Récupérer le surnageant en notant les volumes.	18. Centrifuger 10 minutes à 13000 rpm, RT.
18. Garder à -20°C.	19. Récupérer le surnageant en notant les volumes.
	20. Garder à -20°C.

* Ce qui est noté d'une * sera répété 3X.

8. Extraction nucléaire

8.1 But

Le but de cette manipulation est d'obtenir du lysat contenant les protéines nucléaires.

8.2 Matériel

- Na₂MoO₄, Sigma, USA.
- NaF, Merck, Allemagne.
- Glycérol 87%, Merck, Allemagne.
- PIC et PIB (Tableau 4).

8.3 Méthodes

Méthode d'extraction 1	Méthode d'extraction 2
1. Rincer avec 5 ml de PBS+NaF+Na ₂ MoO ₄ .	1. Rincer avec 5 ml de PBS+NaF+Na ₂ MoO ₄ .
2. Ajouter 10 ml d'HB 1X par boîte et incuber 3 minutes sur glace.	2. Ajouter 10 ml d'HB 1X par boîte et incuber 3 minutes sur glace.

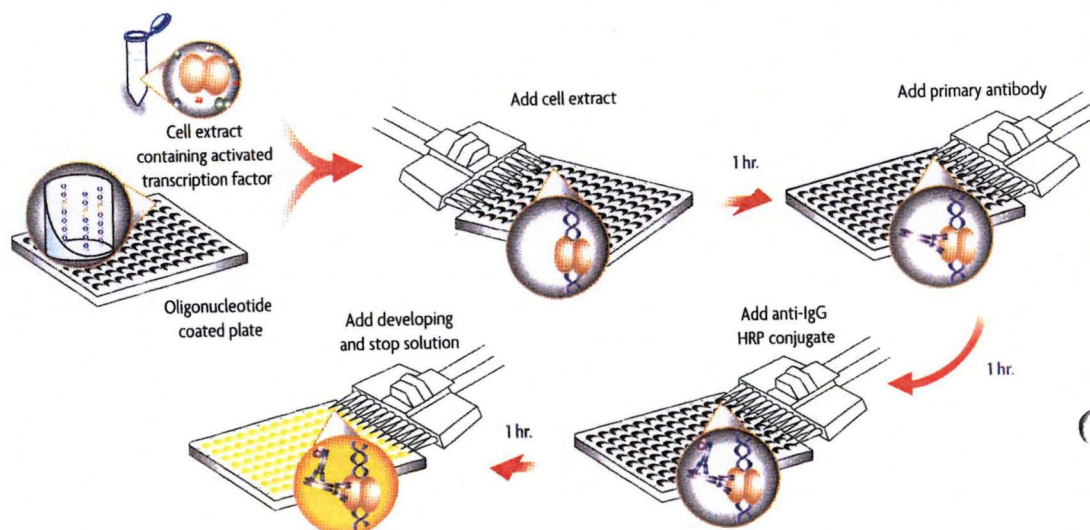


Figure 3 : Principe du Trans-AM.

Tableau 10 : Solutions pour Trans-AM.

Solutions	Préparations
Tampon binding p53	<p>Tampon de binding 2X : TrisHCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM, Glycérol 20%, H₂O pour mettre à volume, pH 7,5.</p> <p>Tampon de binding complet 1X :</p> <ul style="list-style-type: none"> -2 ml de tampon binding 2X. -20 µl de polydIC 1 µg/µl. -1,976 ml d'H₂O.
Tampon binding HIF-1	<p>Tampon de binding 5X : TrisHCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 250 mM, Glycérol 25%, H₂O stérile pour mettre à volume, pH 7,8.</p>

3. Décanner et racler les cellules dans 500 µl de tampon de lyse (Tableau 9).	3. Décanner et racler les cellules dans 500 µl de tampon de lyse (Tableau 9).
4. Transférer le lysat dans 1 eppendorf sur glace.	4. Transférer le lysat dans 1 eppendorf sur glace.
5. Centrifuger 30 secondes à 13000 rpm, RT.	5. Centrifuger 30 secondes à 13000 rpm, RT.
6. Décanner le surnageant.	6. Décanner le surnageant.
7. Resuspendre le culot dans 50µl de RE.	7. Resuspendre le culot dans 50µl de RE.
8. Ajouter 50µl de SA1 par tube.	8. Ajouter 50µl de SA2 par tube.
9. Tourner 20 minutes sur roue à 4°C.	9. Tourner 20 minutes sur roue à 4°C.
10. Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm, 4°C.	10. Centrifuger 15 minutes à 13000 rpm, 4°C.
11. Aliquoter les surnageants (2 de 100 µl chacun et 1 de 15 µl) et congeler à -70°C.	11. Aliquoter les surnageants (2 de 100 µl chacun et 1 de 15 µl) et congeler à -70°C.

9. Trans-AM

9.1 But et principe de la méthode (Figure 3).

Le but de cette méthode est la détection de la liaison de facteurs transcriptionnels (FT) à l'ADN. On utilise des plaques multi-puits (96) préalablement tapissées par des ADN « trappeurs » attachés par un système biotine-streptavidine. Ces ADN « trappeurs » contiennent la séquence consensus reconnue par le facteur transcriptionnel étudié. La détection des facteurs liés à l'ADN s'effectue au moyen d'un anticorps primaire spécifique de ce facteur et d'anticorps secondaires, couplés à une peroxydase.

9.2 Matériel

- Plaques 96 puits tapissées avec des trappeurs contenant la séquence de liaison à l'ADN pour HIF-1 ou p53.
- Solutions (Tableau 10).
- pipette multichannel avec tips Biohit (Finlande).
- Anti p53 mouse, Santa Cruz, USA, SC-6243.
- Anti-HIF-1α mouse, BD Transduction Laboratories, n°610958.

9.3 Méthode

9.3.1 Etapes communes à p53 et HIF-1

Les échantillons sont préparés sur glace et les quantités requises de lysat et de tampon de lyse (1 ou 2) sont ajoutés. 40µl de tampon de binding 1X sont placés dans chaque puits de la plaque. On dépose ensuite 10 µl de lysat dilué par puits en respectant l'organisation des plaques. Les plaques sont incubées sur vortex, à température ambiante pendant 1 heure.

9.3.2 Etapes propres à p53 et HIF-1

P53	HIF-1
1. Laver 3X avec 200 µl de PBS ₅₀ + Tween 0,1%.	1. Laver 3X avec 200 µl de PBS ₅₀ + Tween 0,1% + BSA 0,1%.
2. Fixation de l'anticorps primaire anti-p53,	2. Fixation de l'anticorps primaire anti-HIF-

	-5 µl DTT 0,5 M. -3 ml d'H ₂ O.
Solution de rinçage HIF, tween 0,1%, BSA 0,1%	Pour 160 ml : -160 ml de PBS ₅₀ . -160 µl de Tween. -160 mg BSA.
Solution de rinçage p53, Tween 0,1%	Pour 160 ml : -160 ml de PBS ₅₀ . -160 µl de Tween.
Ac primaire anti-HIF et p53 (8 ml) sur plaque p53	Anticorps dilué 1000X dans du PBS ₅₀ +BSA 0,5%.
Ac primaire anti-HIF et p53 (8 ml) sur plaque HIF	Anticorps dilué 1000X dans du PBS ₅₀ +BSA 0,1%.
Ac secondaires anti-souris, Santa Cruz, SC2055 Ac secondaire anti-lapin, Santa Cruz, SC2054	Anticorps dilué 1000X dans 8 ml de PBS ₅₀ +Gloria 1%.
PBS ₅₀	-10 mM PO ₄ . -50 mM NaCl. -pH 7,5.

dilué 1000X dans du PBS ₅₀ +BSA 0,5%.	1α, dilué 1000X dans du PBS ₅₀ +BSA 1%.
3. Incuber 1h00 à RT.	3. Incuber 1h00 à RT.
4. Laver 3X avec 200 µl de PBS ₅₀ + Tween 0,1%.	4. Laver 3X avec 200 µl de PBS ₅₀ + Tween 0,1% + BSA 0,1%.
5. Fixation de l'anticorps secondaire, dilué 1000X dans du PBS ₅₀ +Gloria 1%, dont on ajoute 100 µl/puits.	5. Fixation de l'anticorps secondaire, dilué 1000X dans du PBS ₅₀ +Gloria 1%, dont on ajoute 100 µl/puits.
6. Incuber 60 minutes à RT.	6. Incuber 60 minutes à RT.
7. Laver 4X avec 200 µl de PBS ₅₀ + Tween 0,1%.	7. Laver 4X avec 200 µl de PBS ₅₀ + Tween 0,1% + BSA 0,1%.
8. Placer 100 µl de TMB/puits.	8. Placer 100 µl de TMB/puits.
9. Incuber 5-10 minutes à l'abri de la lumière.	9. Incuber 15-20 minutes à l'abri de la lumière.
10. Ajouter 100 µl de solution stop.	10. Ajouter 100 µl de solution stop.
11. Faire éclater les petites bulles avec une aiguille pour éviter les interférences.	11. Faire éclater les petites bulles avec une aiguille pour éviter les interférences.
12. Lire la DO à 450 mn, référence 655 nm.	12. Lire la DO à 450 mn, référence 655 nm.

10. Extraction d'ARN total

10.1 Matériel

- Kit RNA Gent, Promega.
- Cellscraper scellés, RNase free.
- Pipettes pasteur RNase free, TTP, Switzerland.
- Tips à filtre scellés.
- Ethanol 75% RNase free.

10.2 Méthode

Après incubation, les boîtes de cellules sont décantées. 600 µl de solution de dénaturation à 4°C sont déposés dans chaque boîte. Le tapis cellulaire est ensuite raclé et transféré dans des eppendorfs RNase free sur glace. On ajoute 60 µl d'acétate de sodium par tube et on mélange bien. On ajoute 600 µl de phénol-chlorophorme-isophénylcool et on vortexe. Les tubes sont mis au repos durant 15 minutes sur glace. Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm, durant 15 minutes, à 4°C. On récupère la phase supérieure (aqueuse) qui contient l'ARN soluble et on la transfère dans une autre série d'eppendorfs RNase free. On ajoute 600 µl d'isopropanol (permet la précipitation de l'ARN) et on place les tubes à -20°C durant 15-30 minutes. Après cette précipitation, on centrifuge 10 minutes à 13000 rpm, à 4°C. On obtient un culot constitué d'ARN après avoir décanté le surnageant constitué d'isopropanol. Les culots sont lavés avec 1 ml d'éthanol 75% à 4°C. Les échantillons seront centrifugés à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. L'éthanol est ensuite décanté au maximum et les tubes sont mis à sécher ouverts. Une fois secs, les échantillons sont resuspendus dans 50 µl d'eau RNase free, et 2 µl sont prélevés et déposés dans des eppendorfs RNase free pour permettre le dosage d'ARN.

Fluorescence

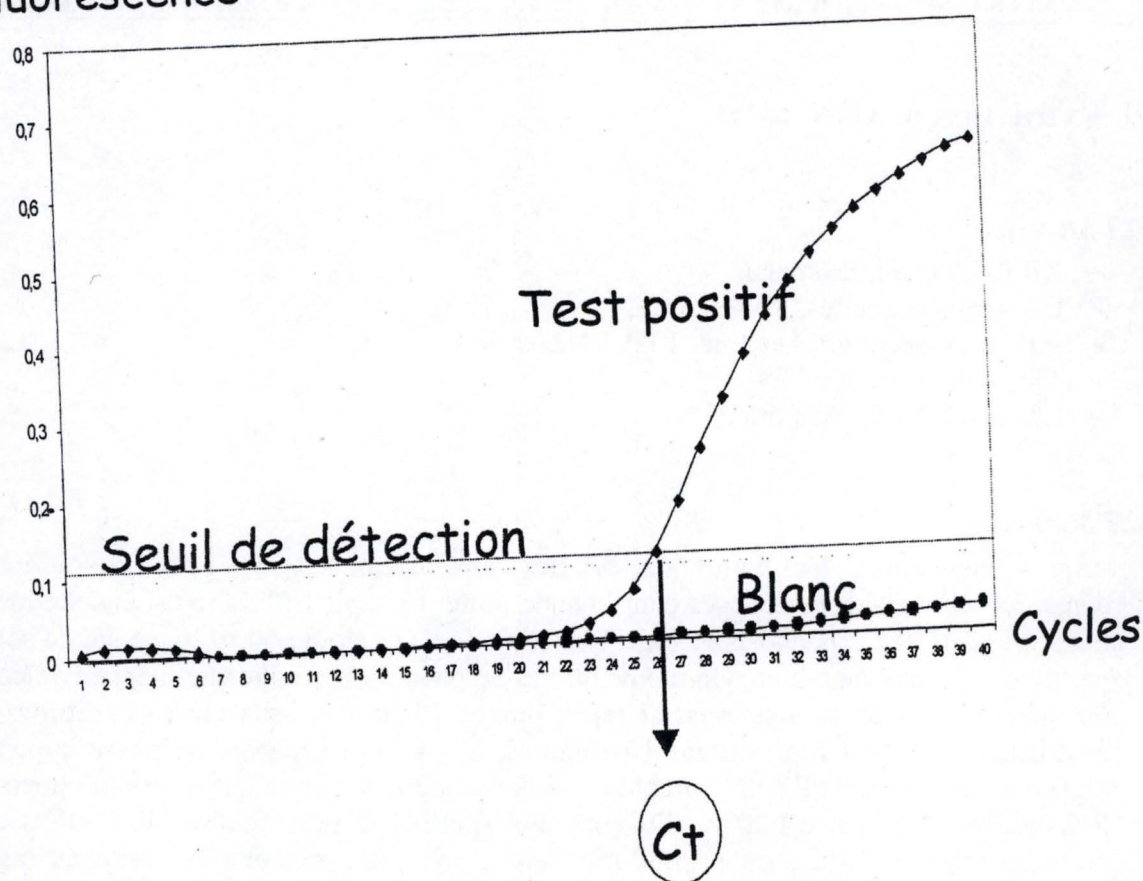


Figure 4 : Représentation graphique de l'augmentation exponentielle de la quantité d'amplicons au cours des cycles PCR et des blancs PCR par rapport au seuil de détection.

11. Reverse transcription

11.1 Objectif de la méthode

L'objectif est de rétrotranscrire l'ARN purifié au cours de l'étape précédente en ADNc, qui sera ensuite amplifié au cours de la Real-time PCR.

11.2 Matériel

- Oligo-dT, Invitrogen, USA.
- Buffer RT, Invitrogen, USA.
- DTT 0,1 M, Invitrogen, USA.
- RNAsin Ribonuclease inhibitor (40 U/μl), Promega, Madison, USA.
- dNTP mix, Eurogentech, Seraing, Belgique.
- SuperscriptII (200 U/μl), Invitrogen, USA.
- RNase H (2 U/μl), Invitrogen, USA.

11.3 Méthode

L'ARN total est mélangé à l'oligo-dT selon le principe suivant : x μl pour 2 μg d'ARN+H₂O+ 2 μl oligo-dT pour un volume final de 9,5 μl. Ce mix est incubé 10 minutes à 70°C, après quoi il est mis sur glace durant 5 minutes. Durant ce temps, on prépare le mélange de réaction suivant:

Par eppendorf :

4 μl Buffer RT 5X.

2 μl de DTT 0,1M.

1 μl RNAsin.

2 μl dNTP mix.

On ajoute 9 μl de mix par eppendorf et on incube 5 minutes à RT. On ajoute ensuite 1,5 μl de SuperscriptII par tube et on incube successivement 1h30 à 42°C pour permettre la rétrotranscription et 15 minutes à 70°C pour dénaturer l'enzyme. Les dernières étapes sont d'ajouter 1 μl de RNase H par tube, d'incuber ces tubes 20 minutes à 37°C et de congeler le tout à -20°C. La RNase H va dégrader les ARN présents dans les échantillons.

Real-time PCR (Figure 4)

12.1 Principe

Cette méthode permet de quantifier l'expression d'ARNm d'un gène d'intérêt pour les différentes conditions testées. La PCR permet d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un fragment d'ADN grâce à un couple d'amorces spécifiques de ce gène encadrant le fragment à amplifier. Dans le cadre de la real time RT PCR, la quantité d'amplicons produits est directement mesurable par l'intensité de fluorescence d'une molécule intercalante qui est ajoutée au mix PCR de départ (SYBR Green). Le SYBR Green s'intercale entre les amplicons double-brins de façon non spécifique et émet un signal fluorescent

proportionnel à la quantité d'ADN double brin présent (Figure 4). Le signal fluorescent émis par le SYBR Green est détecté à partir d'un certain seuil et permet la visualisation de la phase d'amplification exponentielle. La fluorescence augmente de façon exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation (Figure 4). Le cycle auquel la courbe d'amplification croise le seuil de détection est appelé le cycle Ct (threshold cycle). La valeur de Ct est inversement proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc cible présent dans l'échantillon, elle-même proportionnelle à la quantité d'ARN messenger, et servira de point de comparaison entre les différentes conditions après qu'elles aient été normalisées par la valeur de Ct de la tubuline qui sert de « house keeping gene ». Il s'agit d'un gène de référence dont on sait que le niveau transcriptionnel reste stable quelles que soient les conditions étudiées.

12.2 Matériel

- Master mix « SYBR Green PCR » (Applied Biosystems, Holland).
- Plaque 96 puits (Applied Biosystems, Holland).
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, Holland).
- Amorces sens et antisens (Applied Biosystems, Holland).
- Nuclease-free water (Promega, USA).
- 7000 sequence detection system (Applied Biosystem, Netherlands).

12.3 Méthode

La première étape de la real time PCR consiste en la préparation du mix PCR et la dilution de l'ADNc obtenu lors de la transcription inverse. Le mix PCR, pour un puits, se compose de 2,5 µl d'H₂O, 12,5 µl de SYBER Green et de 5 µl de mix de primers. Les primers doivent être préalablement dilués 3x (1/3 de forward, 1/3 de reverse, 1/3 d'eau). Le mix PCR doit être préparé pour chacun des gènes d'intérêt puisqu'ils diffèrent par la séquence des primers mais également pour la tubuline qui permettra de normaliser les valeurs obtenues. L'ADNc obtenu au terme de la real time est dilué 100x.

Ensuite, la plaque est remplie avec 20 µl de mix PCR et 5 µl d'échantillon par puits. Afin de servir de contrôles négatifs, certains puits recevront le mix PCR auquel seront ajoutés 5 µl d'eau. Lorsque la plaque est complétée, elle est recouverte d'un film plastique et centrifugée une minute à 600 rpm. A la fin de la centrifugation, elle est placée dans l'appareil qui exécutera une quarantaine de cycles d'amplification et mesurera la fluorescence associée à chacun des puits tout au long de l'amplification.

Cycle de Real Time PCR

- Dénaturation 5 minutes à 95°C.
- Série de 40 cycles:
 - Dénaturation 15 secondes à 95°C.
 - Hybridation / élongation 1 min à 65°C.

12.4 Analyse des résultats

L'analyse des résultats commence par la détermination du seuil de détection. Ce seuil de détection est placé dans la zone de linéarité de la phase d'amplification et au dessus d'une intensité de fluorescence significativement différente du bruit de fond. Les Ct (cycles seuils) s'obtiennent en fixant le seuil de détection à la moitié de la zone d'amplification

exponentielle. Ce cycle seuil correspond au cycle auquel l'intensité de la fluorescence est significativement plus élevée que celle du bruit de fond. L'analyse nécessite ensuite une normalisation de ces valeurs, par les valeurs de Ct obtenue pour la tubuline (House-keeping gene). Après cette normalisation, les valeurs obtenues pour les différentes conditions peuvent être comparées.

Résultats

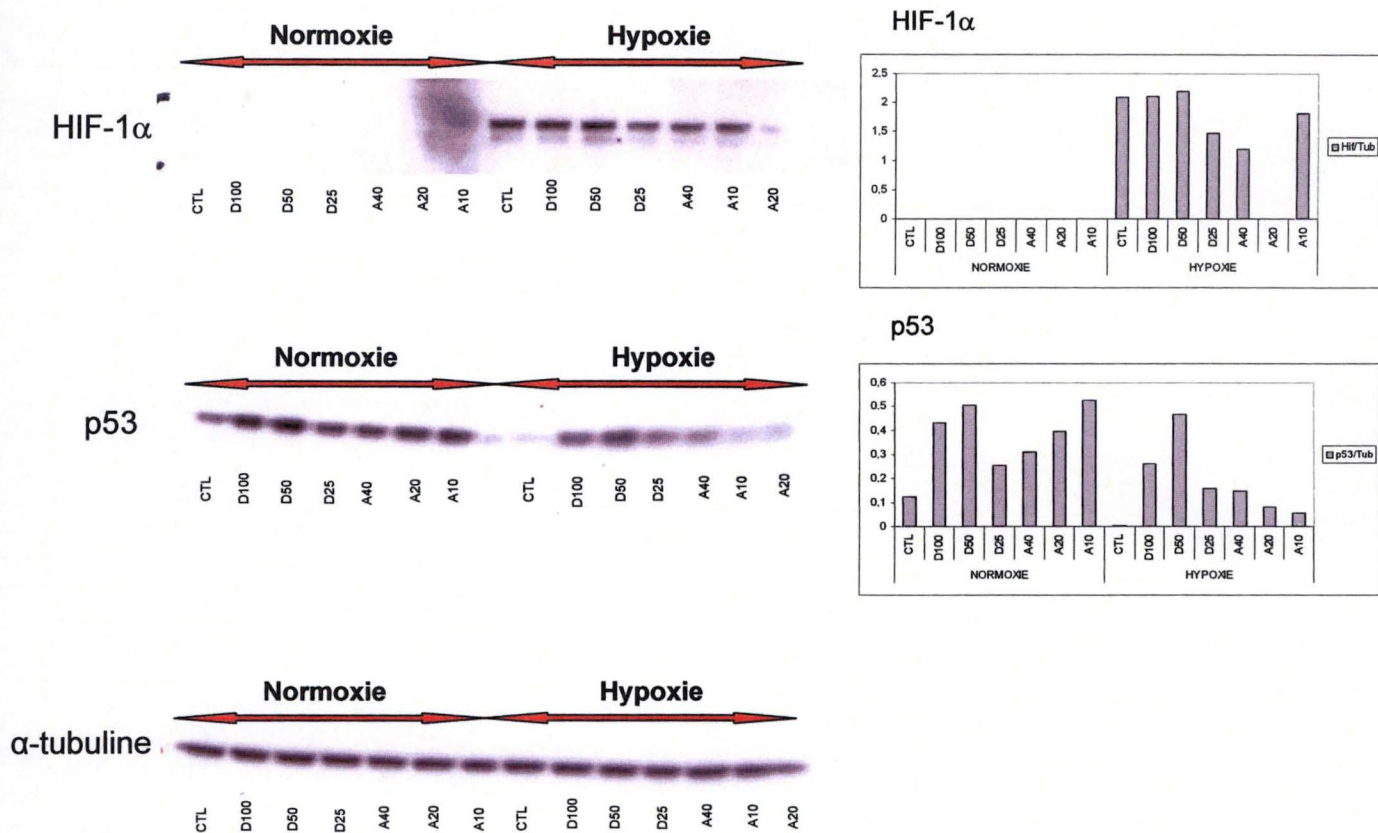


Fig.1: Niveaux d'expression de HIF-1 α et de p53 révélés par western Blot. Les cellules HepG2 ont été incubées 5 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB et Apigénine) à différentes concentrations (μ M). La membrane a été révélée avec un anticorps anti-HIF-1 α ou avec un anticorps anti-p53 et la quantité de protéines transférées sur la membrane a été estimée avec un anticorps anti-tubuline α . Les intensités des bandes correspondant à HIF-1 α et à p53 ont été normalisées par celles de l' α -tubuline des puits correspondants et sont présentées dans le graphique.

Résultats

Ce travail est divisé en deux parties : une première partie dans laquelle les effets de deux inhibiteurs de la CK2 seront étudiés, sur la quantité, la liaison à l'ADN et l'activité de HIF et de p53. La seconde partie est consacrée à l'étude des interactions entre HIF et p53. Le présent travail s'est basé sur une hypothèse de travail qui postule une double inhibition, de HIF-1 par p53 et de p53 par la CK2 (caséine kinase 2). Si on inhibe la CK2, on devrait donc obtenir une inhibition de HIF-1.

Première partie : Etude de l'influence des inhibiteurs de la CK2 sur l'activité de HIF-1 et de p53

Afin de vérifier l'hypothèse de la double inhibition mentionnée ci-dessus, nous avons suivi l'effet de deux inhibiteurs de la CK2, le DRB et l'apigénine, sur l'activité transcriptionnelle de p53 et de HIF-1. Cette activité peut être régulée à différents niveaux, quantité de protéines, activité de liaison à l'ADN et activité transcriptionnelle proprement dite. Dans le but de comprendre le mécanisme par lequel ces inhibiteurs influencent l'activité de ces deux facteurs de transcription, leurs effets sur les différentes étapes de l'activation de ces facteurs ont été étudiés.

1.1 Effets sur la quantité de protéines

Des cellules HepG2 ou HeLa ont été incubées 5 heures ou 16 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou en l'absence de différentes concentrations en inhibiteurs. Après cette incubation, l'abondance de HIF-1 α , sous-unité régulée par l'hypoxie de HIF-1, et de p53 a été suivie soit en western blot, soit par un marquage en immunofluorescence.

1.1.1 Western blots

1.1.1.1 HepG2 après 5 heures d'incubation en hypoxie (Figure 1)

On observe la présence de HIF-1 α en hypoxie et pas en normoxie, ce qui est normal puisqu'on sait que HIF-1 α est dégradé en normoxie et stabilisé en hypoxie. On observe relativement peu d'effet des inhibiteurs sur la quantité de HIF-1 α en hypoxie.

La quantité de p53 observée en normoxie est plus élevée que celle observée en hypoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie). Un effet des inhibiteurs est observable, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie, sans toutefois être dépendant de la dose (CTLs vs conditions). On observe cependant toujours une augmentation de la quantité de p53 lors de l'incubation en présence des différentes concentrations en inhibiteurs de la CK2.

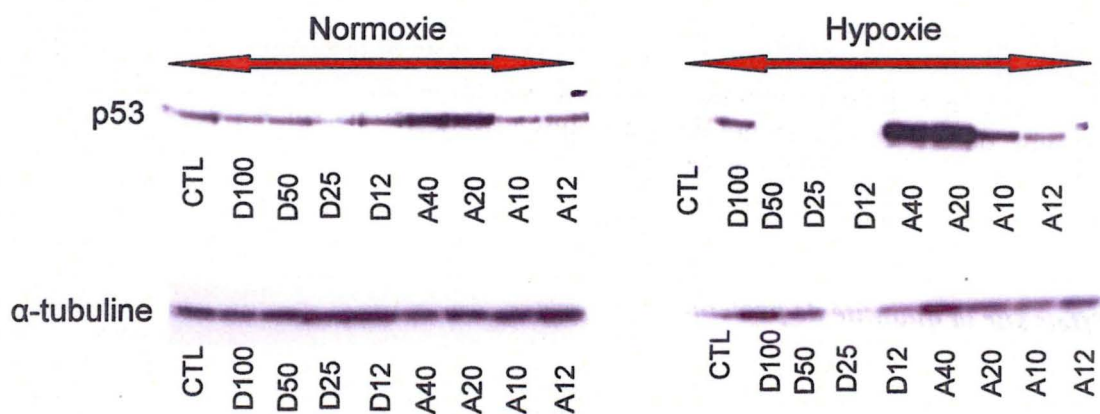
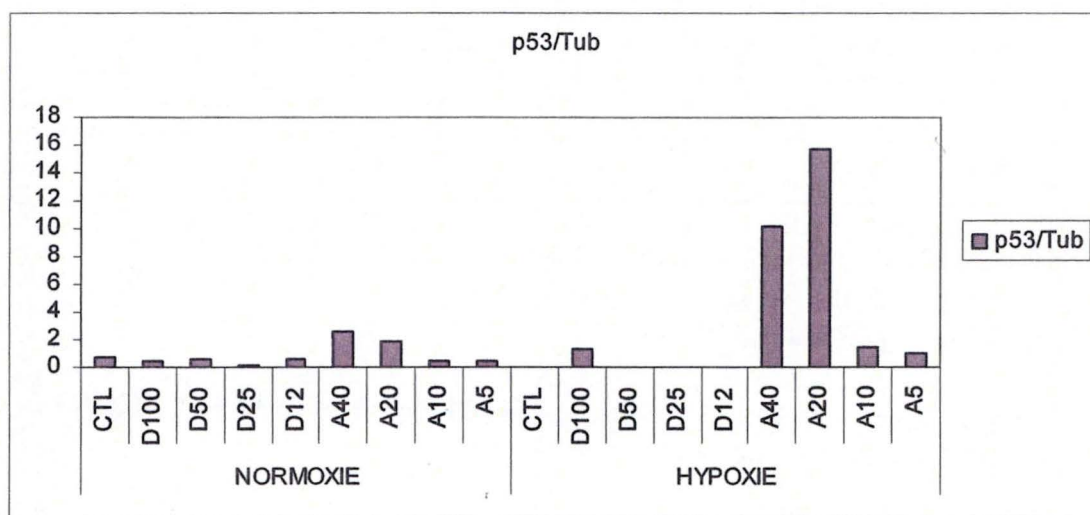


Fig.2: Niveau d'expression de p53 révélé par western Blot. Les cellules HepG2 ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB et Apigénine)    différentes concentrations (μ M). La membrane a été r  v  l  e avec un anticorps anti-p53 et la quantité de protéines transférées sur la membrane a été estim  e avec un anticorps anti- α -tubuline. Les intensités des bandes correspondant à p53 ont été normalis  es par celles de l' α -tubuline des puits correspondants et sont pr  sent  es dans le graphique.

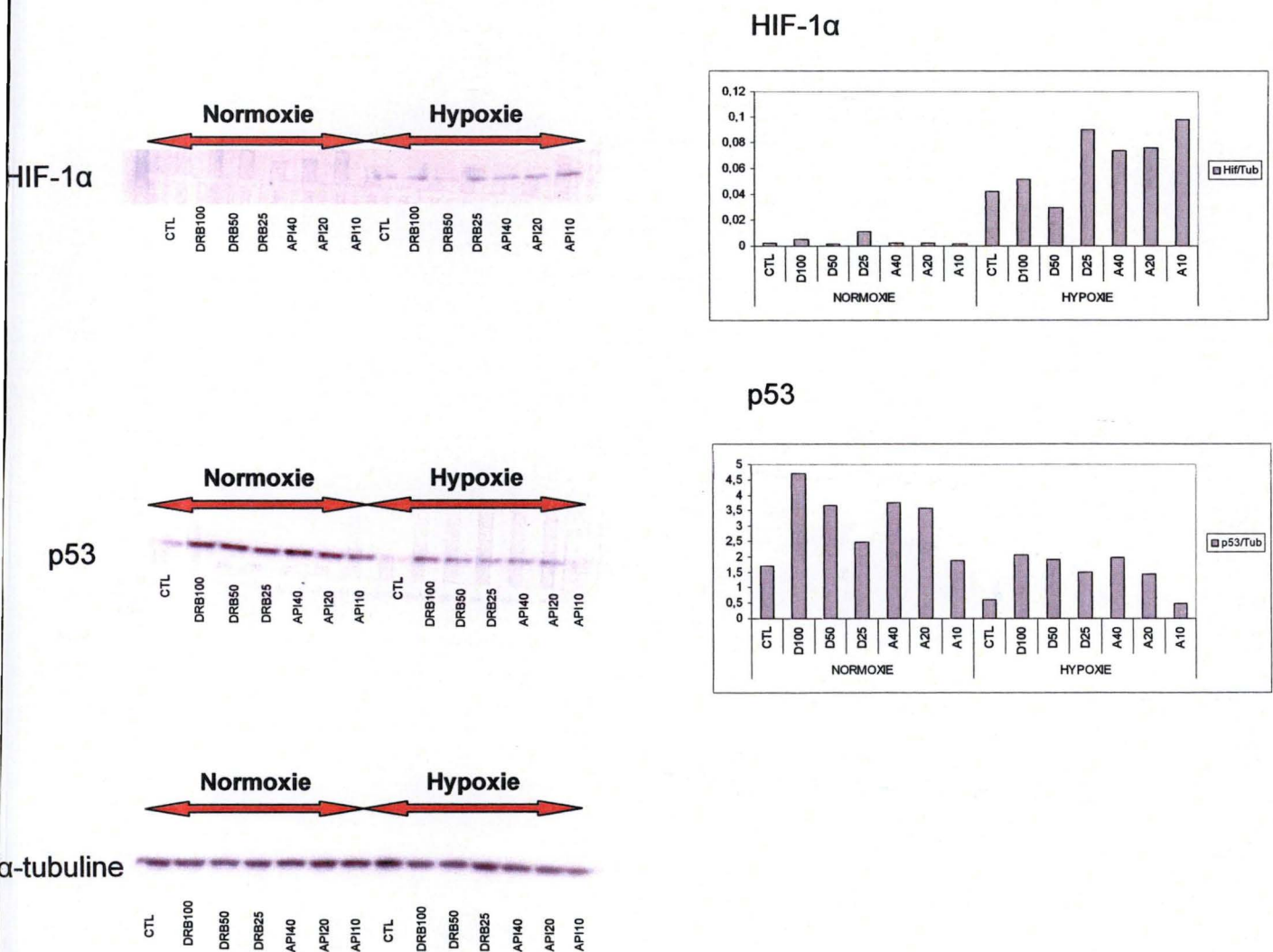


Fig.3: Niveaux d'expression de HIF-1 α et de p53 révélés par western Blot. Les cellules HeLa ont été incubées 5 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB et Apigénine) à différentes concentrations (μ M). La membrane a été révélée avec un anticorps anti-HIF-1 α ou avec un anticorps anti-p53 et la quantité de protéines transférées sur la membrane a été estimée avec un anticorps anti- α -tubuline. Les intensités des bandes correspondant à HIF-1 α et à p53 ont été normalisées par celles de l' α -tubuline des puits correspondants et sont présentées dans le graphique.

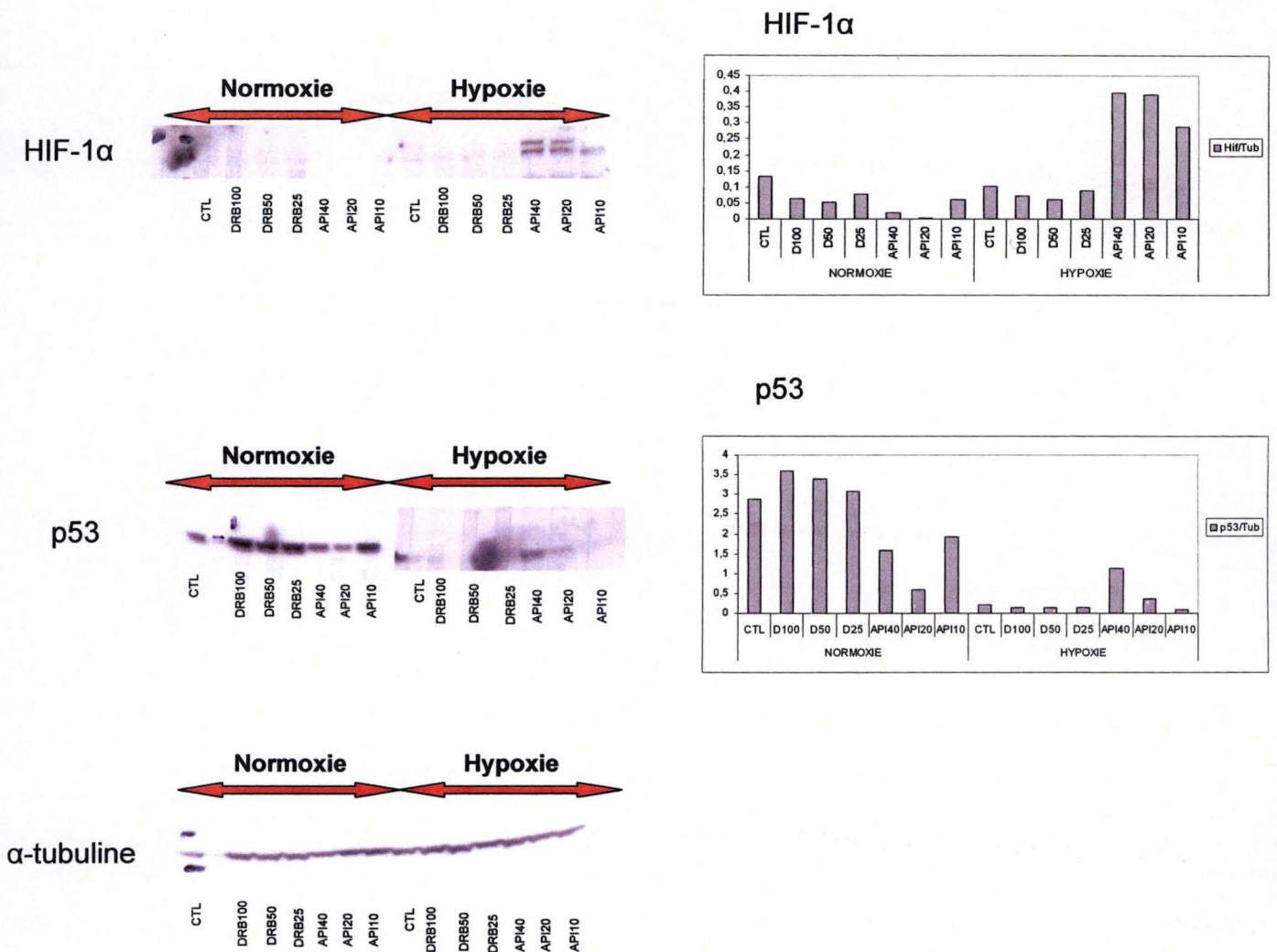


Fig.4: Niveaux d'expression de HIF-1 α et de p53 révélés par western Blot. Les cellules HeLa ont été incubées 16 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB et Apigénine) à différentes concentrations (μ M). La membrane a été révélée avec un anticorps anti-HIF-1 α ou avec un anticorps anti-p53 et la quantité de protéines transférées sur la membrane a été estimée avec un anticorps anti-tubuline α . Les intensités des bandes correspondant à HIF-1 α et à p53 ont été normalisées par celles de l' α -tubuline des puits correspondants et sont présentées dans le graphique.

Ces résultats montrent que la quantité de p53 est importante en normoxie, alors que celle de HIF-1 α est insignifiante, alors qu'en hypoxie, la quantité de p53 est beaucoup plus faible, ce que l'on peut observer en parallèle à une forte augmentation de la quantité de HIF-1 α . Il n'y a cependant pas de corrélation entre l'effet des inhibiteurs en hypoxie sur les quantités respectives des deux protéines.

1.1.1.1 HepG2 après 16 heures d'incubation en hypoxie (Figure 2)

La quantité de p53 après 16 heures d'incubation en hypoxie devient difficilement détectable. L'apigénine augmente fortement la quantité de p53 en normoxie et en hypoxie alors que l'effet du DRB n'est observable qu'à la plus forte concentration et en hypoxie (Figure 2).

1.1.1.2 HeLa après 5 heures d'incubation en hypoxie (Figure 3)

Comme pour les HepG2, la quantité de HIF-1 α est beaucoup plus élevée en hypoxie qu'en normoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie). Le DRB ne semble pas affecter la quantité de HIF-1 α en hypoxie, alors que l'apigénine semble augmenter cette quantité (CTL hypoxie vs conditions hypoxie).

La quantité de p53 est plus faible en hypoxie qu'en normoxie, ce qui confirme nos précédentes observations (CTL normoxie vs CTL hypoxie). On constate un effet dépendant de la concentration en inhibiteurs, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie. Une quantité plus importante de p53 est observée à forte concentration en inhibiteurs (DRB 100 mM ou Api 40 mM) et la quantité de p53 décroît lorsque la concentration d'inhibiteurs diminue. L'effet est similaire en normoxie et en hypoxie.

La quantité importante de p53 en normoxie correspond à nouveau à une faible quantité de HIF-1 α , tandis qu'en hypoxie, la faible quantité de p53 coïncide avec une quantité importante de HIF-1 α .

1.1.1.3 HeLa après 16 heures d'incubation en hypoxie (Figure 4)

La quantité de HIF-1 α en hypoxie est beaucoup plus faible après 16 heures d'incubation que celle observée après 5 heures. Cette observation a déjà été réalisée sur les cellules HepG2 (Mottet *et al*, 2003). Comme observé après 5 heures d'incubation, l'apigénine augmente la quantité de HIF-1 α en hypoxie alors que le DRB n'a pas d'effet.

La quantité de p53 est plus faible en hypoxie qu'en normoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie). Cette diminution induite par l'hypoxie est plus marquée que celle observée après 5 heures d'incubation. En normoxie, la quantité de p53 est augmentée par le DRB, mais pas par l'apigénine. En hypoxie, c'est l'apigénine qui augmente la quantité de p53, mais pas le DRB.

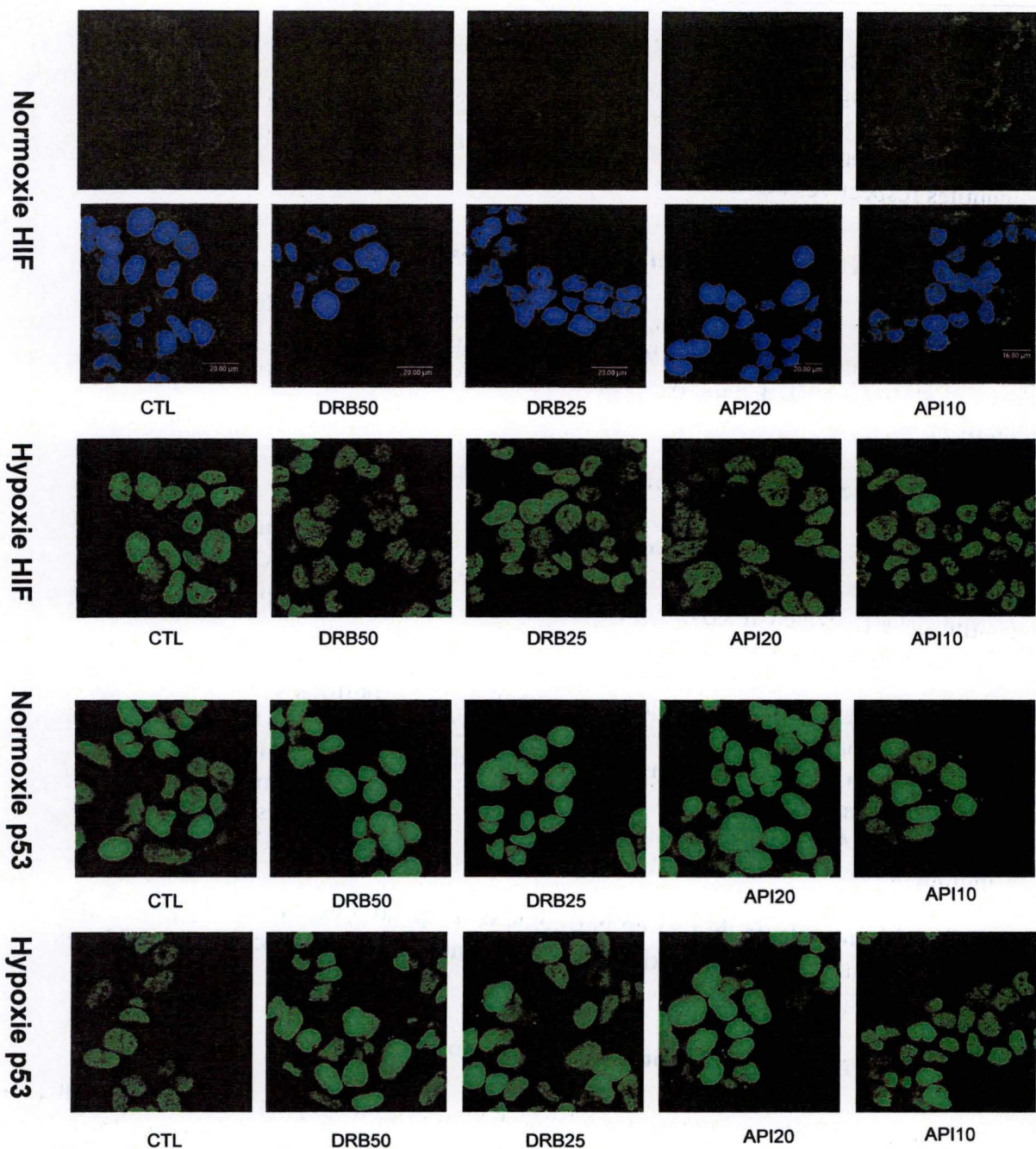


Fig.5: Effets de l'hypoxie et des inhibiteurs sur la localisation et l'expression des protéines HIF-1 α et p53. Les cellules HepG2 ont été incubées 5 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'inhibiteurs de la CK2 (DRB, Apigénine) à différentes concentrations (μ M). Les protéines HIF-1 α et p53 ont été détectées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique anti-HIF-1 α ou anti-p53. Le noyau est coloré au TOPRO-3 (bleu). Les cellules ont été ensuite observées au microscope confocal (Grossissement: 40X) en maintenant le photomultiplicateur constant.

1.1.1.4 Immuno-fluorescence (Figure 5)

Afin de confirmer les résultats obtenus en western blot, une expérience en immunofluorescence a été réalisée pour des cellules HepG2 incubées en hypoxie durant 5 heures. Nous avons choisi 5 heures d'incubation, parce que la quantité en HIF-1 α est supérieure à celle obtenue après 16 heures d'incubation sous hypoxie.

Comme précédemment, aucun marquage pour HIF-1 α n'apparaît dans les cellules maintenues en normoxie, indiquant que cette protéine n'est pas présente. HIF-1 α s'accumule dans les cellules incubées en hypoxie et se localise dans les noyaux des cellules.

Un effet des inhibiteurs est visible en hypoxie sur la quantité de HIF-1 α présente dans les noyaux (CTL hypoxie vs conditions hypoxie). Le DRB et l'apigénine semblent diminuer la quantité de HIF-1 α . Un effet de la concentration en DRB est observé en hypoxie; il y a moins de HIF-1 α en condition DRB 50 qu'en condition DRB 25. L'effet de la concentration en apigénine est moins clair.

En normoxie, la quantité de p53 est plus importante qu'en hypoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie); dans les deux cas, la protéine est nucléaire. Les deux inhibiteurs augmentent nettement cette quantité et en normoxie, et en hypoxie. Le signal arrivant à saturation en normoxie (CTL normoxie vs conditions normoxie), il est difficile de voir un effet de la concentration en inhibiteurs. En hypoxie, l'effet des inhibiteurs est dépendant de la concentration.

1.1.2 Conclusions

L'hypoxie engendre une augmentation importante de la quantité de HIF-1 α dans les cellules, alors qu'une diminution de l'abondance de p53 est observée. Si l'hypoxie se prolonge (de 5 à 16 heures), la quantité de HIF-1 α tend à diminuer et celle de p53 est encore plus basse. Les inhibiteurs de la CK2, après 5 heures d'incubation, semblent diminuer légèrement la quantité de HIF-1 α dans les HepG2, alors qu'une augmentation est observée dans les cellules HeLa en présence d'apigénine. D'autre part, les inhibiteurs augmentent toujours la quantité de p53, que ce soit en normoxie ou en hypoxie, et ce, dans les deux types cellulaires.

1.2 Effets sur la liaison à l'ADN de HIF-1 α et de p53

Comme une augmentation ou une diminution de la quantité de protéine d'un facteur de transcription ne se traduit pas nécessairement par une augmentation ou une diminution de son activité, l'effet des inhibiteurs de la CK2 sur l'activité de liaison à l'ADN et sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et de p53 a été étudiée. Afin de suivre l'activité de liaison à l'ADN des deux facteurs, un test trans-AM a été réalisé (voir point 11 du matériel et méthodes).

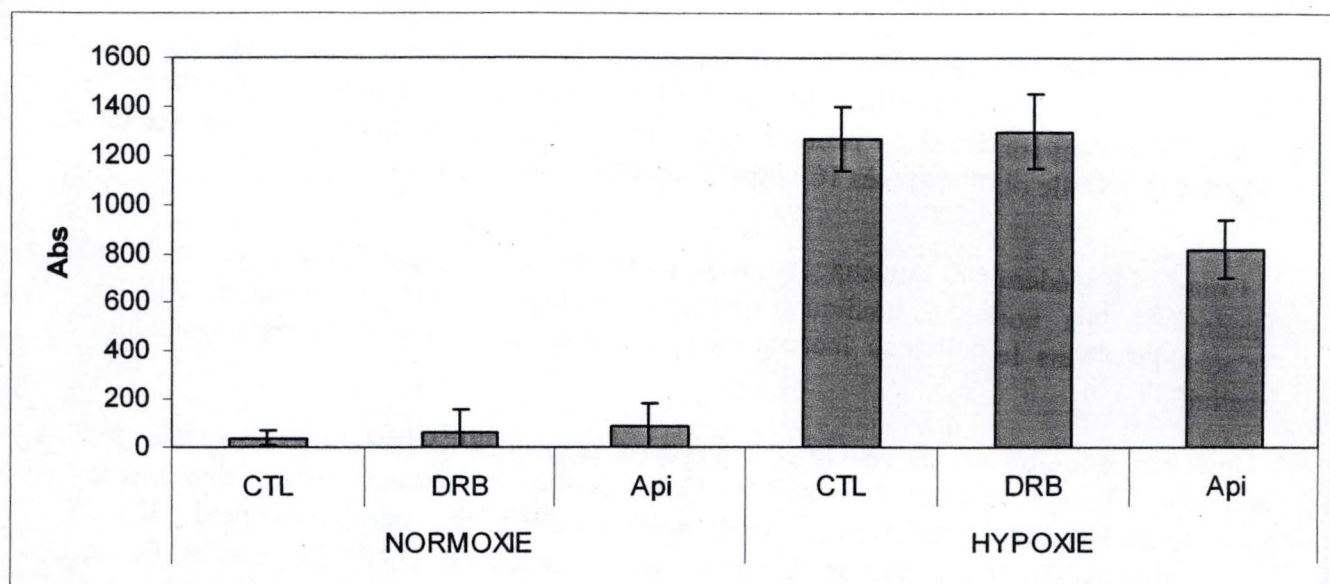


Fig.6: Effet de l'hypoxie et des inhibiteurs de la CK2 sur la liaison de HIF-1 à sa séquence consensus. Un trans-AM a été réalisé sur des extraits nucléaires de cellules HeLa incubées 5 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou sans inhibiteurs de la CK2 (DRB à 50 μ M, Apigénine à 20 μ M). La révélation a été effectuée avec des anticorps primaires anti-HIF-1 α qui ont ensuite été détectés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Les résultats sont présentés en unités d'absorbance (X1000) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

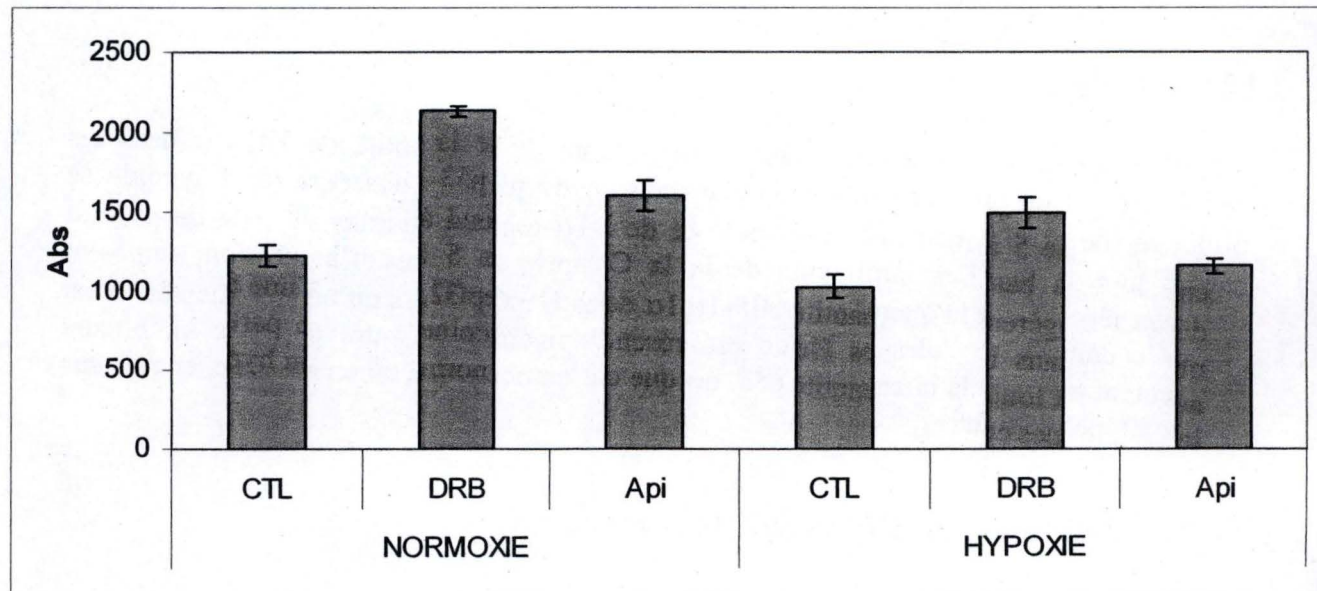
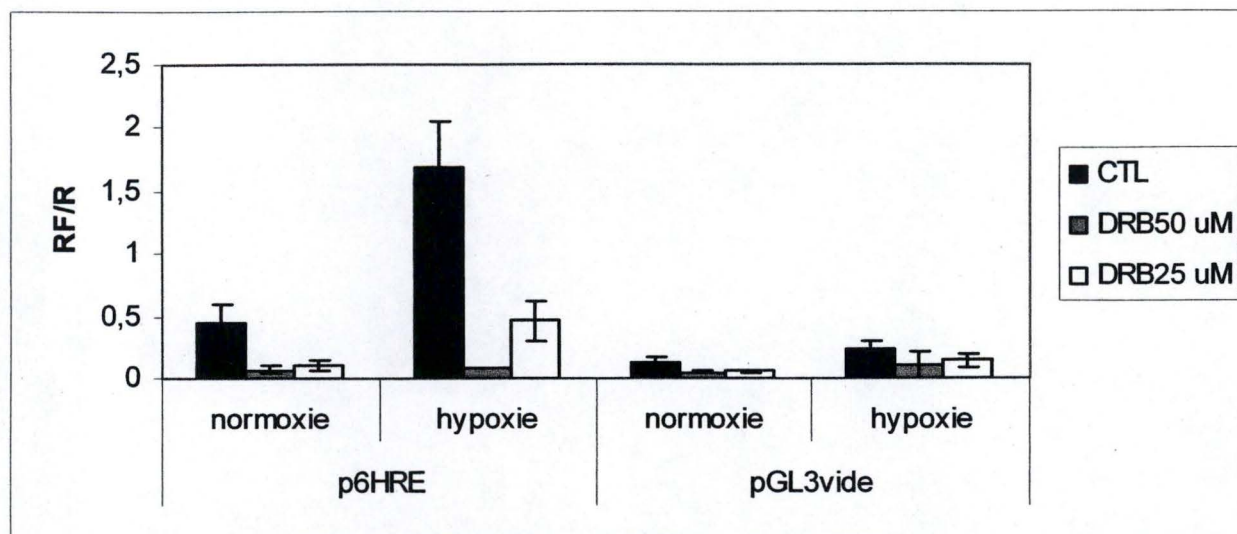


Fig.7: Effet de l'hypoxie et des inhibiteurs sur la liaison de p53 à sa séquence consensus. Un trans-AM a été réalisé sur des extraits nucléaires de cellules HeLa incubées 5 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou sans inhibiteurs de la CK2 (DRB à 50 μ M, Apigénine à 20 μ M). La révélation a été effectuée avec des anticorps primaires anti-p53 qui ont ensuite été détectés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Les résultats sont présentés en unités d'absorbance (X1000) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

Effets du DRB sur HIF-1



Effets de l'apigénine sur HIF-1

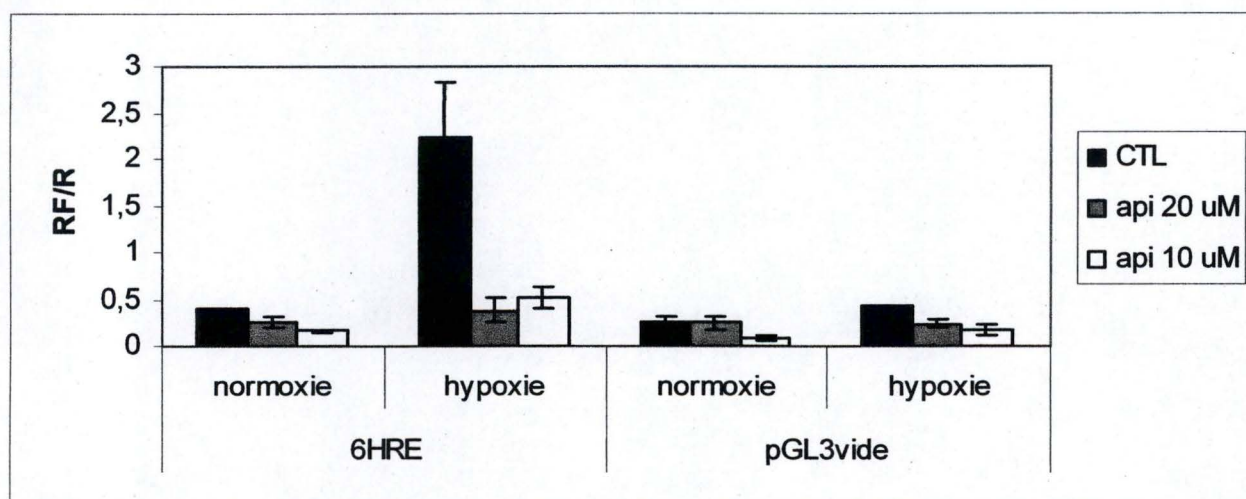


Fig.8: Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules HepG2 ont été transfectées durant 3 heures avec les plasmides du système rapporteur PGL3 vide ou PGL3-p6HRE et pRL-SV40. Suite à une incubation de 16 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'inhibiteurs de la CK2 (DRB, Apigénine) à différentes concentrations, les cellules ont été lysées et l'activité des luciférases a été mesurée dans les lysats. Les résultats sont présentés en rapport entre l'activité de la Firefly et l'activité de la Renilla en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

1.2.1 Effet des inhibiteurs sur la liaison de HIF-1 à sa séquence consensus (Figure 6)

En normoxie, on n'observe pas de liaison de HIF-1 à sa séquence consensus, ce qui est cohérent avec le fait qu'on n'observe pas de protéine HIF-1 α en western blot ou en immunofluorescence dans les cellules. Par contre, en hypoxie, le facteur HIF-1 est bien présent et capable de se lier à l'ADN. On observe donc une liaison beaucoup plus forte en hypoxie qu'en normoxie. Le DRB ne semble pas affecter la liaison à l'ADN en hypoxie contrairement à l'apigénine qui la diminue. En normoxie, aucun effet des inhibiteurs n'est visible.

1.2.2 Effet des inhibiteurs sur la liaison de p53 à sa séquence consensus (Figure 7)

On observe que la liaison de p53 à sa séquence consensus est plus importante en normoxie qu'en hypoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie). Le DRB augmente la liaison de p53 à sa séquence consensus en hypoxie et en normoxie (CTL vs DRB, normoxie et hypoxie). L'apigénine augmente la liaison de p53 à sa séquence consensus en normoxie, mais n'a que peu d'effet en hypoxie.

1.2.3 Conclusions

Un parallélisme est observé pour HIF-1 et p53, entre l'abondance de la HIF-1 α et p53 respectivement et leur activité de liaison à l'ADN, pour ce qui est de l'effet de l'hypoxie, mais aussi pour celui des inhibiteurs.

1.3 Effets sur l'activité transcriptionnelle

Afin de suivre l'activité transcriptionnelle des deux facteurs de transcription, deux approches ont été utilisées. Premièrement, un système rapporteur dans lequel l'expression de la luciférase est régulée par six boîtes HRE pour HIF-1 et quinze boîtes pour p53, a permis de suivre l'activité des deux facteurs. Deuxièmement, nous avons quantifié l'expression d'un gène cible pour chacun des deux facteurs de transcription, soit par western blot, soit par real-time PCR.

1.3.1 Systèmes rapporteurs

1.3.1.1 Mesure de l'activité de HIF-1 (Figure 8)

Deux vecteurs rapporteurs ont été utilisés : p6HRE contient 6 séquences consensus auxquelles se lie HIF-1 et pGL3 vide est un plasmide ne contenant aucune séquence consensus et servant de contrôle négatif. Ces plasmides contiennent la séquence d'une luciférase dont le produit a une activité facilement quantifiable.

Le contrôle de spécificité (pGL3 vide) est caractérisé par une très faible activité de la luciférase, et ce, quelles que soient les conditions : ni l'hypoxie, ni les inhibiteurs n'influencent cette faible activité, ce qui montre que HIF-1 ne se lie pas à l'ADN de façon non spécifique et que les inhibiteurs n'ont pas non plus d'influence non spécifique.

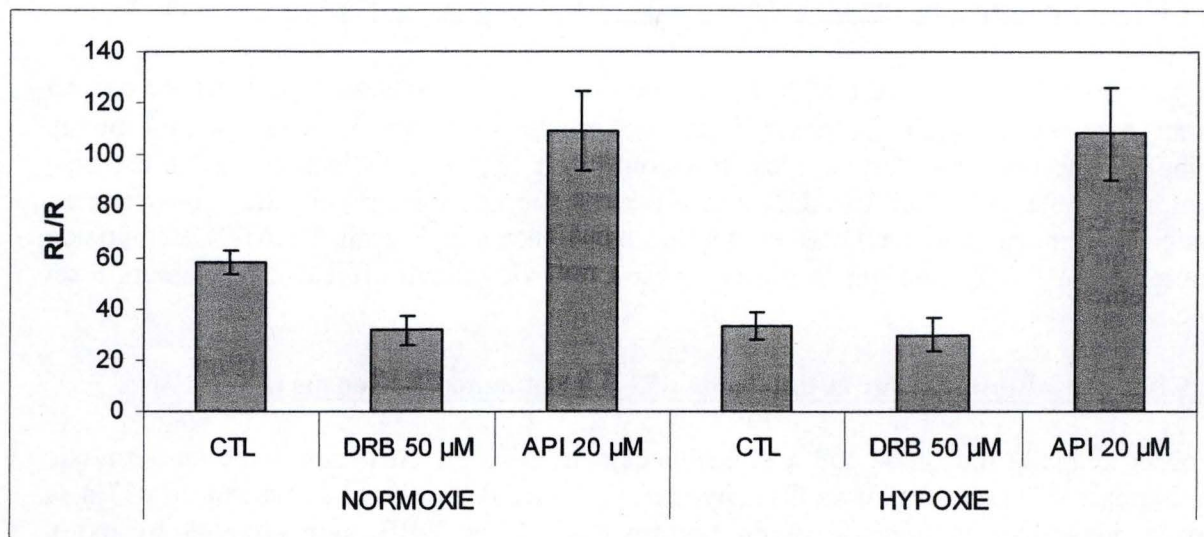


Fig.9: Mesure de l'activité transcriptionnelle de p53. Les cellules HepG2 ont été transfectées durant 3 heures avec des plasmides du système rapporteur PGL3-p53RE et pRL-SV40. Suite à une incubation de 16 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou non d'inhibiteurs de la CK2 (DRB, Apigénine), les cellules ont été lysées et l'activité des luciférase a été mesurée dans les lysats. Les résultats sont présentés en rapport entre l'activité de la Firefly et l'activité de la Renilla en tant que moyennes ± 1 écart-type (n=3).

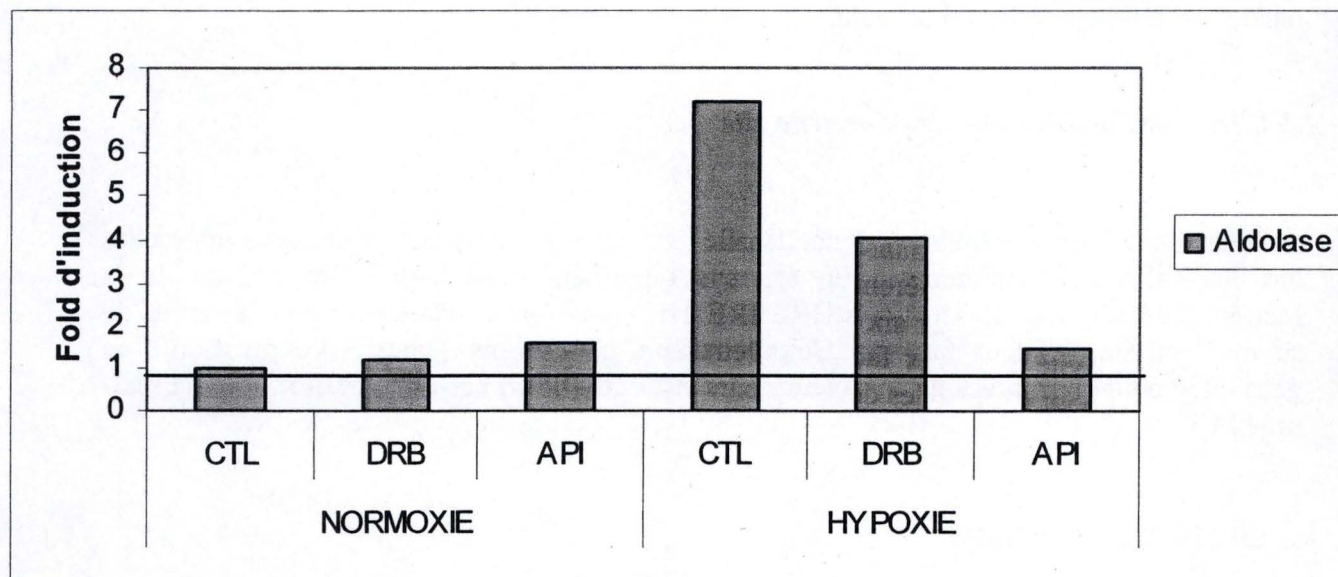


Fig.10: Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en suivant l'expression de l'ARN messenger de l'aldolase par une real-time PCR. Les cellules HepG2 ont été incubées 16 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou en absence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB à 50 μ M, Apigénine à 20 μ M). Ces cellules ont ensuite été lysées et l'ARN en a été extrait. Une transcription inverse a permis la production d'ADNc à partir des ARN messagers. Cet ADNc a ensuite été amplifié par real-time PCR en présence d'amorces spécifiques à l'Aldolase et de Syber green. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité d'ARN messenger de l' α -tubuline. Les résultats sont exprimés en niveau d'induction par rapport aux cellules contrôles en normoxie.

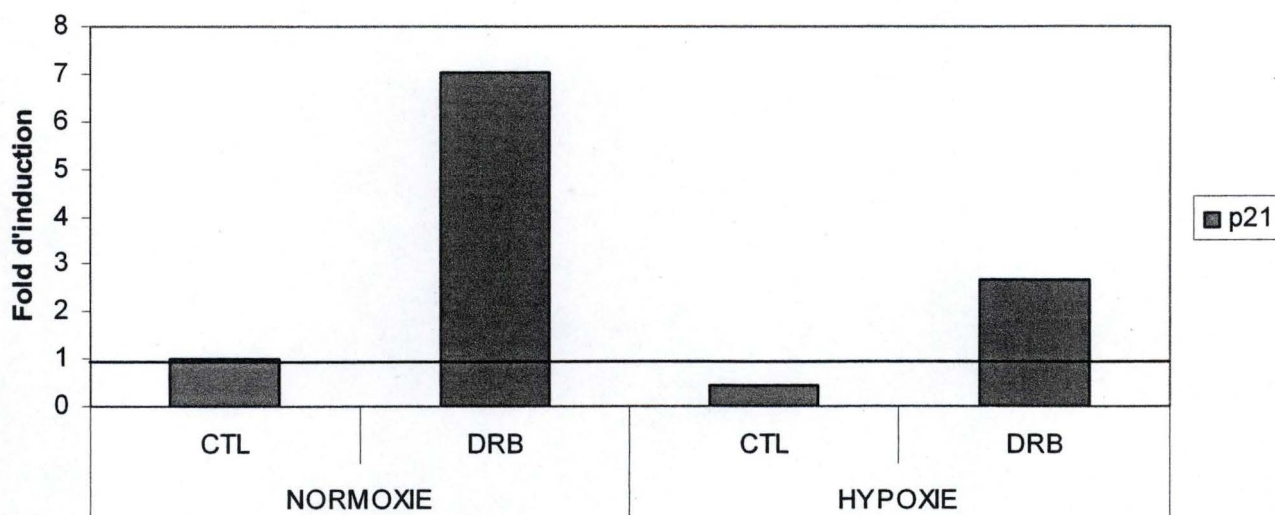


Fig.11: Mesure de l'activité transcriptionnelle de p53 en suivant l'expression de l'ARN messager de p21 par real-time PCR. Les cellules HepG2 ont été incubées 16 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou en absence de DRB à 50 μ M. Ces cellules ont ensuite été lysées et l'ARN a été extrait. Une transcription inverse a permis la production d'ADNc. Cet ADNc a ensuite été amplifié par real-time PCR en présence d'amorces spécifiques de p21 et de Syber green. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité d'ARN messager de l' α -tubuline. Les résultats sont exprimés en niveau d'induction par rapport aux cellules contrôles en normoxie.

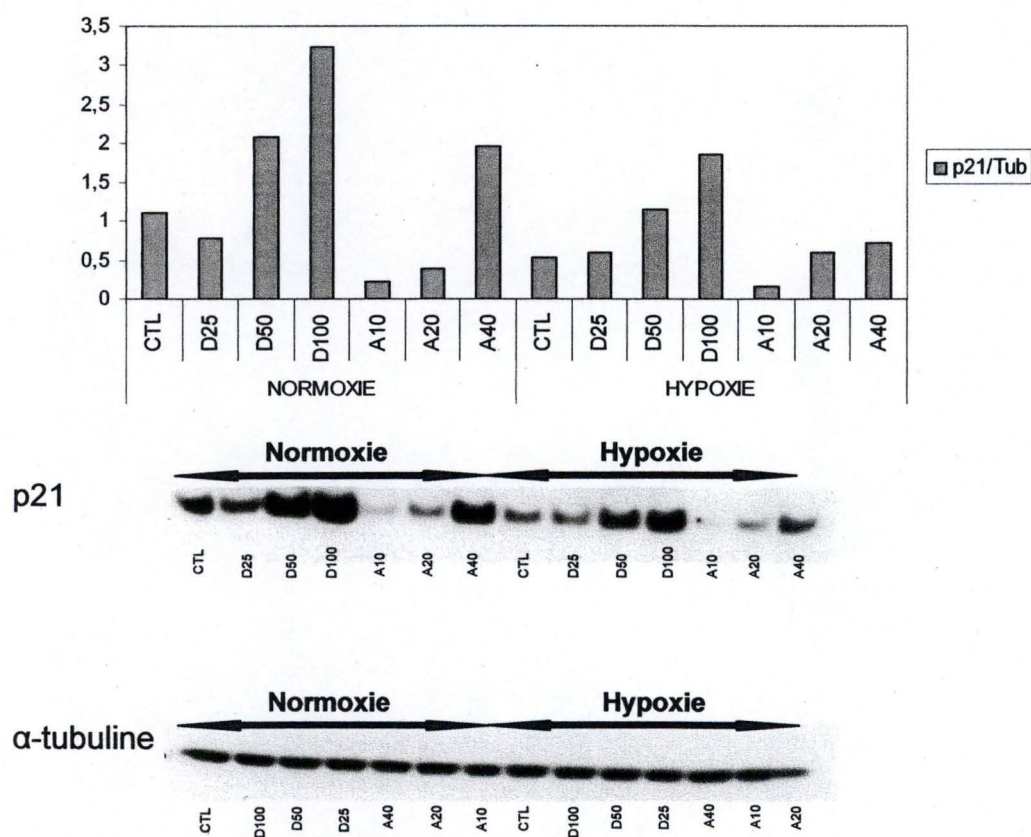


Fig.12: Niveau d'expression de p21 révélé par western Blot. Les cellules HepG2 ont été incubées 5 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB et Apigénine) à différentes concentrations (μ M). La membrane a été révélée avec un anticorps anti-p21 et la quantité de protéines transférées sur la membrane a été estimée avec un anticorps anti-tubuline α . Les intensités des bandes correspondant à p21 ont été normalisées par celles de l' α -tubuline des puits correspondants et sont présentées dans le graphique.

Lorsque le système p6HRE est utilisé, on constate une activité luciférase beaucoup plus importante en hypoxie qu'en normoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie, système p6HRE), ce qui traduit une activité de HIF-1 accrue. Le DRB induit une inhibition de l'activité de HIF-1, puisque l'activité de la luciférase est nettement plus faible en sa présence aussi bien en normoxie qu'en hypoxie. A 50 μ M, il n'y a pas de différence d'activité entre la normoxie et l'hypoxie, alors que cette différence redevient discernable lorsque la quantité de DRB diminue (25 μ M). En hypoxie, une forte inhibition de l'activité de HIF-1 par l'apigénine est également observée. Cette inhibition est dépendante de la concentration (CTL hypoxie vs conditions hypoxie).

1.3.1.2 Mesure de l'activité de p53 (Figure 9)

L'activité de p53 est mesurée à l'aide du système rapporteur contenant 15 sites de liaison pour ce facteur. On observe une activité plus forte de p53 en normoxie qu'en hypoxie. Le DRB diminue l'activité de p53 en normoxie et n'a pas d'effet en hypoxie. Par contre, l'apigénine augmente de manière importante l'activité de p53 en normoxie et en hypoxie.

1.3.2 Gènes cibles de HIF-1 α et de p53

Afin de confirmer les résultats obtenus en utilisant les systèmes rapporteurs, nous avons estimé l'activité de HIF-1 et de p53 en suivant l'expression d'un gène cible, l'aldolase pour HIF-1 et p21 pour p53.

1.3.2.1 Real-time PCR pour l'aldolase (gène cible de HIF-1) (Figure 10)

La quantité d'ARN messager de l'aldolase a été mesurée par real time PCR.

L'aldolase est peu exprimée en normoxie et les inhibiteurs n'ont pas d'effet marqué. En hypoxie, l'aldolase est beaucoup plus exprimée, 7 fois plus qu'en normoxie, indiquant que HIF-1 est bien activé dans ces conditions.

L'action des inhibiteurs est bien visible en hypoxie. Le DRB provoque une diminution du niveau d'induction qui passe de 7 fois (CTL hypoxie) à 4 fois (DRB hypoxie), et l'apigénine a ici l'effet le plus spectaculaire : le niveau d'induction passe de 7 fois à 1,5 fois (API hypoxie). Comme dans le système rapporteur, les résultats montrent que le DRB et l'apigénine induisent une forte inhibition de l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

1.3.2.2 Real-time PCR sur gène de p21 (Gène cible de p53) (Figure 11)

La quantité d'ARN messager de p21 a été mesurée par real time PCR. La quantité d'ARN messager de p21 est 50% plus faible en hypoxie qu'en normoxie.

L'effet du DRB est très marqué, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie. En normoxie, le niveau d'induction de p21 pour les cellules traitées avec le DRB est 7 fois plus en présence du DRB. Ceci signifie que p21 est exprimé 7 fois plus avec le DRB en normoxie que dans le cas du contrôle, et donc p53 est 7 fois plus actif en normoxie qu'en hypoxie. Cette diminution de l'activité de p53 en normoxie correspond aux résultats obtenus à l'aide du système rapporteur et à la diminution de la quantité de p53 détectée par western blot et en immuno-fluorescence.

En hypoxie, le niveau d'induction entre les cellules contrôle et les cellules traitées au DRB est 5 fois plus important pour les cellules traitées au DRB, ce qui traduit une augmentation de l'activité de p53. L'effet de l'apigénine n'a pas été testé.

1.3.2.3 Western blot pour p21 (Figure 12)

Comme on n'observe pas de parallélisme entre l'effet du DRB sur l'activité de p53 mesurée par le système rapporteur et celle mesurée en suivant la quantité d'ARN messager de p21, nous avons également mesuré la quantité de protéine de p21.

La quantité de p21 est plus importante en normoxie qu'en hypoxie. Le DRB augmente la quantité de p21 en normoxie et en hypoxie à forte concentration (100 mM) et a un effet décroissant au fur et à mesure que diminue sa concentration. L'apigénine a un effet similaire à celui du DRB, en normoxie comme en hypoxie. Ces effets sont similaires à celui observé, pour le DRB, en suivant l'abondance de l'ARN messager de p21 ainsi qu'à ceux observés sur l'abondance de p53.

1.3.2.4 Comparaison des graphiques de l'aldolase et de p21

L'hypoxie augmente l'activité de HIF-1 comme le montre l'augmentation de la quantité d'ARN messager de l'aldolase, alors que celle de p53 est diminuée puisqu'on observe une diminution de la quantité d'ARN messager de p21.

Le DRB augmente l'expression de p21 et diminue celle de l'aldolase en hypoxie, ce qui correspond à une activité accrue de p53, mais à une activité diminuée de HIF-1.

En normoxie, l'action du DRB est visible sur l'activité de p53, mais n'est pas visible sur HIF-1, puisque celui-ci n'est pas actif dans ces conditions.

1.4 Discussion des résultats

On observe en hypoxie une diminution de la quantité et de l'activité de p53, parallèlement à une augmentation de l'activité de HIF-1.

Le DRB et l'apigénine augmentent l'activité (vérifié par étude de p21 par real time PCR et par western) et la quantité de p53 (vérifié par étude de p53 par western et par IF). Par ailleurs, ces inhibiteurs diminuent l'activité de HIF-1 (vérifié par quantification de l'ARN messager de l'aldolase par real time PCR et par système rapporteur), mais ne modifient pas la quantité de HIF-1 α . Ces résultats suggèrent une régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 proprement dite. L'hypothèse proposée au départ pourrait donc être vraie, puisqu'une inhibition de la CK2 provoque une augmentation de la quantité et de l'activité de p53 et une diminution de l'activité de HIF-1. Est-ce par une interaction directe ? C'est ce nous avons étudié dans la seconde partie du travail.

Deuxième partie : Etude des interactions entre HIF-1 α et p53

Afin de confirmer que les effets des inhibiteurs de la CK2 sur HIF-1 passent par une augmentation de p53, différentes approches ont été utilisées afin de mettre en évidence

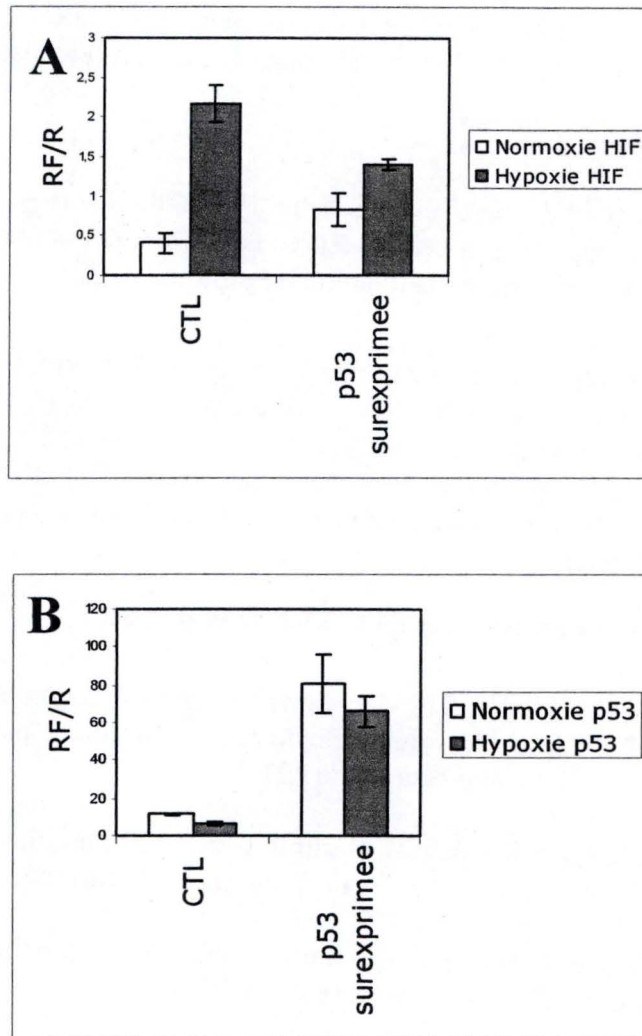


Fig.13: Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et de p53. Les cellules HepG2 ont été co-transfectées durant 3 heures avec un plasmide du système rapporteur PGL3-p6HRE (A) ou PGL3-p53RE (B) et un plasmide d'expression p53wt/pCMV. Suite à une incubation de 16 heures en normoxie ou en hypoxie, sans inhibiteurs, les cellules ont été lysées et l'activité des luciférase a été mesurée dans les lysats. Les résultats sont présentés en rapport entre l'activité de la Firefly et l'activité de la Renilla en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

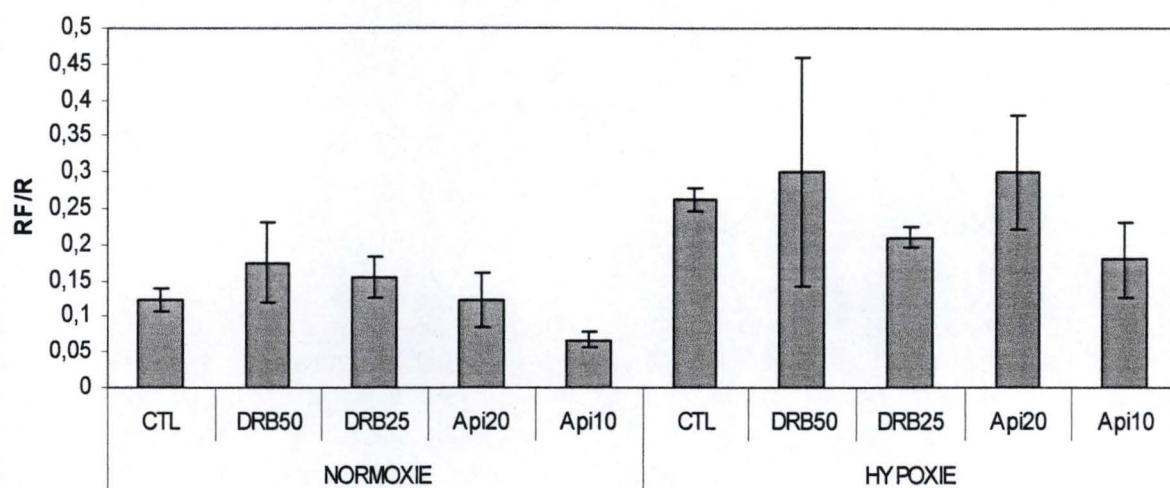


Fig.14: Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Les cellules Hep3B ont été transfectées durant 3 heures avec les plasmides du système rapporteur PGL3-p6HRE et pRL-SV40. Suite à une incubation de 16 heures en normoxie ou en hypoxie, avec ou sans inhibiteurs de la CK2 (DRB, Apigénine) à différentes concentrations (μM), les cellules ont été lysées et l'activité des luciférase a été mesurée dans les lysats. Les résultats sont présentés en rapport entre l'activité de la Firefly et l'activité de la Renilla en tant que moyennes ± 1 écart-type ($n=3$).

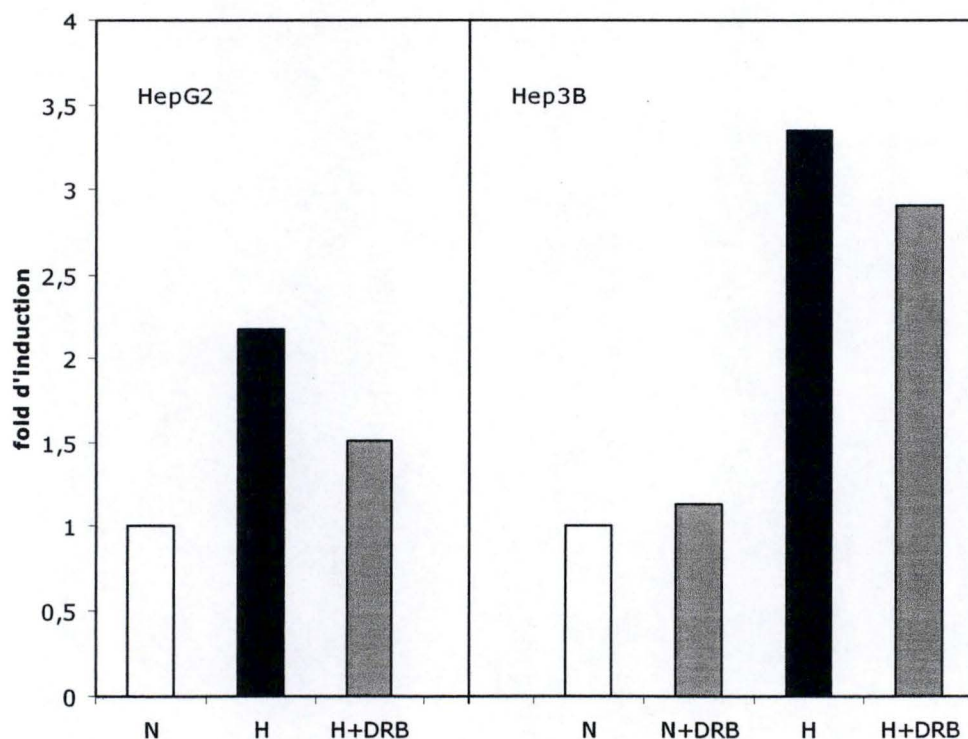


Fig.15: Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en suivant l'expression de l'ARN messager de l'aldolase par real-time PCR. Les cellules HepG2 et Hep3B ont été incubées 16 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou en absence de DRB à 50 μM (inhibiteurs de la CK2). Ces cellules ont ensuite été lysées et l'ARN en a été extrait. L'ADNc rétro-transcrit a été amplifié par PCR en présence d'amorces spécifiques de l'aldolase et de Syber green. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité d'ARN messager de la tubuline- α . Les résultats sont exprimés en niveau d'induction par rapport aux cellules contrôles en normoxie.

une répercussion directe de changements de l'abondance de p53 sur l'activité de HIF-1. Pour ce faire, nous avons surexprimé p53, inhibé p53 à l'aide de pifithrine et utilisé des cellules déficientes en p53. Finalement, nous avons cherché à mettre en évidence une interaction directe entre les deux protéines.

2.1 Surexpression de p53 (Figure 13)

L'effet d'une augmentation de p53 induite par sa surexpression a été étudié sur l'activité de HIF-1 en utilisant un système rapporteur.

En normoxie, une légère augmentation de la liaison à l'ADN de HIF-1 est discernable, lorsque p53 est surexprimé, ce qui est difficile à expliquer puisqu'il y a normalement très peu de HIF-1 actif.

En hypoxie, l'activité de HIF-1 augmente, et celle-ci est inhibée par la surexpression de p53. Ces résultats montrent que l'activité de HIF-1 en hypoxie est inhibée lorsque la quantité de p53 est augmentée, que ce soit en la surexprimant (Figure 13) ou en présence d'inhibiteurs de la CK2 (Figures 8 et 10).

Nous avons vérifié que la surexpression de p53 était efficace en utilisant un système rapporteur pour p53. On observe effectivement une augmentation importante de l'activité luciférase dans les cellules qui surexpriment p53. Par ailleurs, dans les contrôles sans surexpression, on retrouve l'inhibition de l'activité de p53 en hypoxie, comme observé précédemment dans la figure 9.

2.2 Etude de l'activité de HIF-1 dans des cellules Hep3B

Etant donné qu'une surexpression de p53 reproduit les effets observés en présence des inhibiteurs de la CK2, nous pouvons supposer que l'effet des inhibiteurs sur HIF-1 passe par l'augmentation de l'abondance de p53. Si cette hypothèse est correcte, ces inhibiteurs ne devraient plus avoir d'effet sur HIF-1 dans les cellules déficientes pour p53. C'est ce que nous avons testé dans les deux expériences suivantes en utilisant des cellules Hep3B, qui sont similaires aux cellules HepG2, si ce n'est qu'elles n'expriment pas p53.

2.2.1 Système rapporteur (figure 14)

L'activité de HIF-1 a été mesurée par un système rapporteur. Dans les cellules Hep3B, comme précédemment observé dans les cellules HepG2, l'activité de HIF-1 en hypoxie est plus élevée qu'en normoxie. Par contre, les inhibiteurs de la CK2 n'ont pas d'effet, que ce soit en normoxie ou en hypoxie, sur l'activité de HIF-1.

2.2.2 Gène cible de HIF-1 (Figure 15)

L'activité de HIF-1 a également été mesurée par la quantification de l'expression de l'ARN messager de l'aldolase sur une culture cellulaire HepG2 (p53+/+) et sur une culture Hep3B (p53-/-).

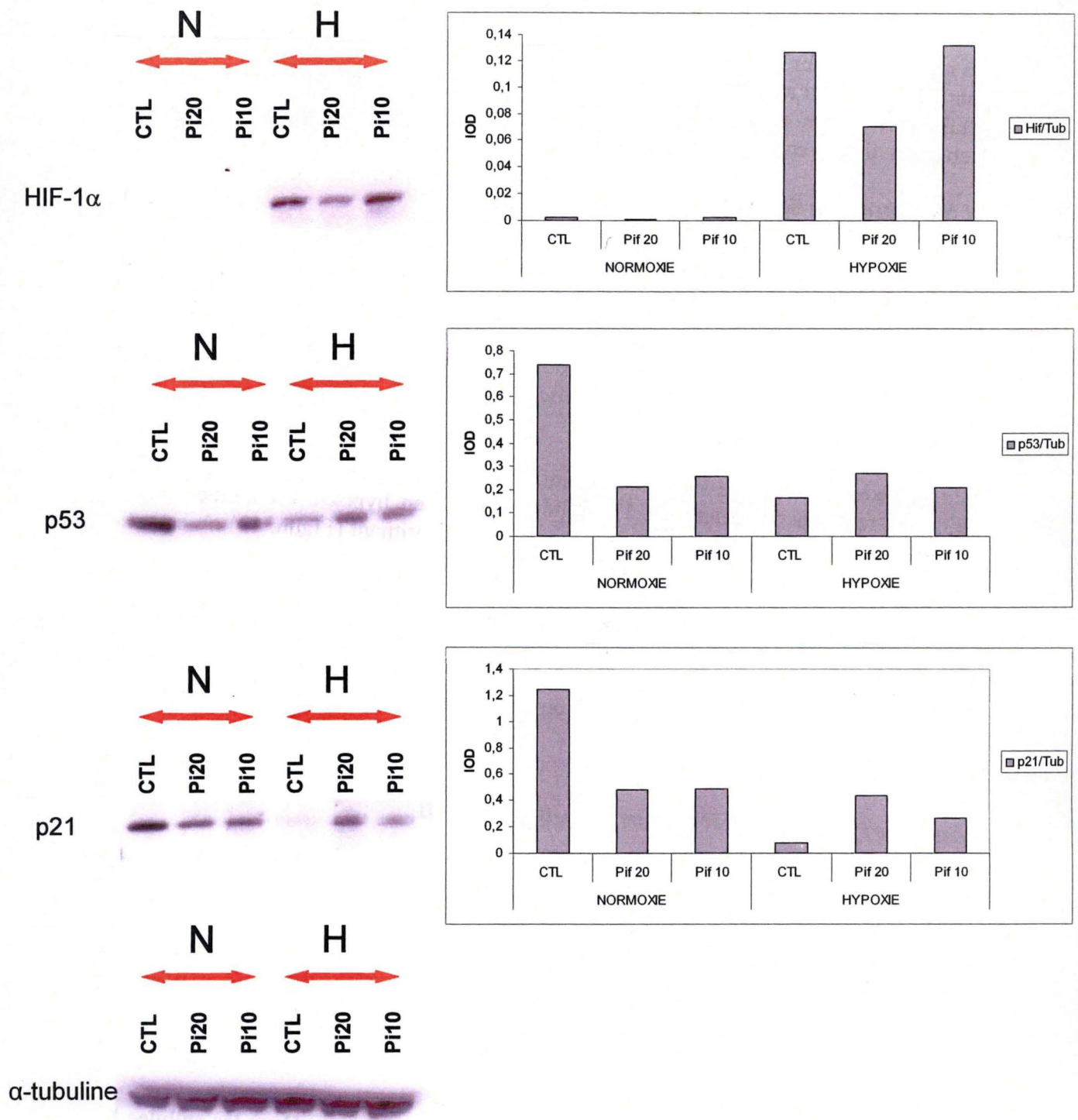


Fig.16: Niveaux d'expression de HIF-1α, de p53 et de p21 révélés par western Blot. Les cellules HepG2 ont été incubées 5 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence ou en absence de pifithrine (inhibiteur de p53) à différentes concentrations (μM). La membrane a été révélée avec un anticorps anti-HIF-1α, avec un anticorps anti-p53 ou avec un anticorps anti-p21 et la quantité de protéines transférées sur la membrane a été estimée avec un anticorps anti-tubuline α. Les intensités des bandes correspondant à p21 ont été normalisées par celles de l'α-tubuline des puits correspondants et sont présentées dans le graphique.

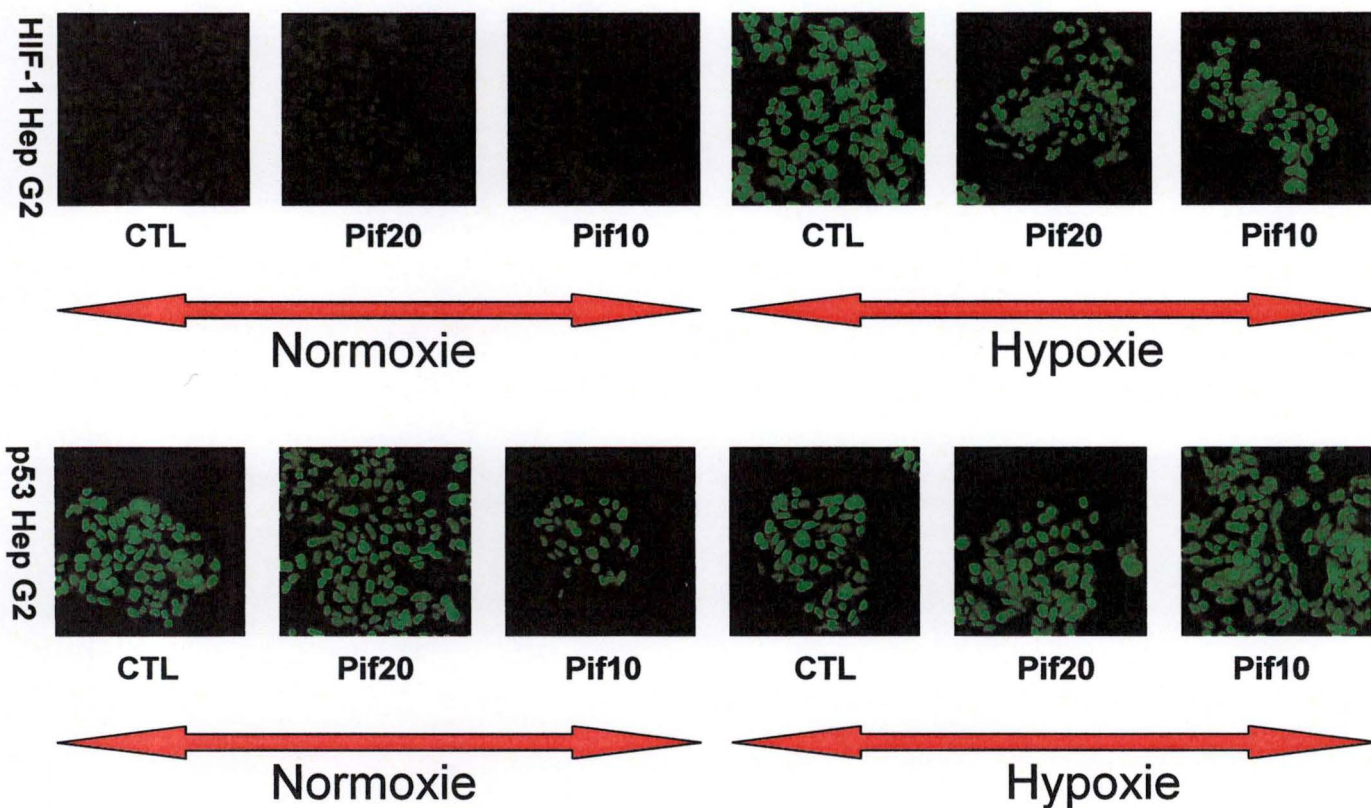


Fig.17: Effets de l'hypoxie et des inhibiteurs sur la localisation et l'expression des protéines HIF-1 α et p53. Les cellules HepG2 ont été incubées 5 heures en normoxie ou en hypoxie, en présence de pifithrine (inhibiteur de p53) à différentes concentrations. Les protéines HIF-1 α et p53 ont été détectées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique anti-HIF-1 α ou anti-p53. Les cellules ont été ensuite observées au microscope confocal.

En ce qui concerne la culture HepG2, une augmentation de l'expression est visible en hypoxie, le DRB diminue d'environ 50% l'expression de l'aldolase, comme déjà observé à la figure 11.

On observe une forte augmentation de l'expression de l'aldolase dans les cellules Hep3B en hypoxie (CTL normoxie vs CTL hypoxie). Le DRB n'affecte pas cette expression en normoxie et seulement de 17% l'expression en hypoxie. Cet effet est donc nettement moindre que celui observé chez les cellules HepG2.

Ces différents résultats suggèrent que les inhibiteurs de la CK2 n'ont pas d'effet sur l'activité de HIF-1 dans des cellules déficientes pour p53.

2.3 Effets de la pifithrine sur la quantité et l'activité de HIF-1

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les cellules Hep3B, un inhibiteur de p53 a été utilisé ; il s'agit de la pifithrine. La pifithrine est un inhibiteur chimique de l'activité transcriptionnelle de p53 (Komarov *et al*, 1999).

2.3.1 Effets de la pifithrine sur la quantité de HIF-1 α et de p53

Les effets de la pifithrine sur la quantité de HIF-1 α et de p53 ont été étudiés sur des cellules HepG2, soumises à une hypoxie de 5 heures. Deux approches ont été utilisées : le western Blot et l'immunofluorescence.

2.3.1.1 Western blot (Figure 16)

En normoxie, HIF-1 α est peu présent, tandis qu'il est présent en plus grande quantité en hypoxie. En hypoxie, la pifithrine induit une diminution de la quantité de HIF-1 α (graphe HIF/Tub, en hypoxie). Cet effet est perdu à la concentration la plus basse.

En ce qui concerne p53, on observe comme précédemment une diminution de la quantité de p53 en hypoxie par rapport à la normoxie. La pifithrine induit une diminution importante de la quantité de p53 en normoxie, mais semble ne plus avoir d'effet en hypoxie.

2.3.1.2 Immunofluorescence (Figure 17)

L'observation de l'ensemble des lames en immunofluorescence révèle l'absence de HIF-1 α en normoxie et sa présence en grande quantité en hypoxie. Comme pour le western blot, on observe une diminution de la quantité de HIF-1 α en présence de pifithrine à la concentration de 20 μ M. Cet effet n'est plus observé à 10 μ M.

En ce qui concerne p53, les résultats obtenus sont tout à fait similaires à ceux mis en évidence par le western blot. L'hypoxie induit une diminution de la quantité de p53. La pifithrine à 20 μ M diminue la quantité de p53 en normoxie, alors qu'elle ne semble pas avoir d'effet en hypoxie.

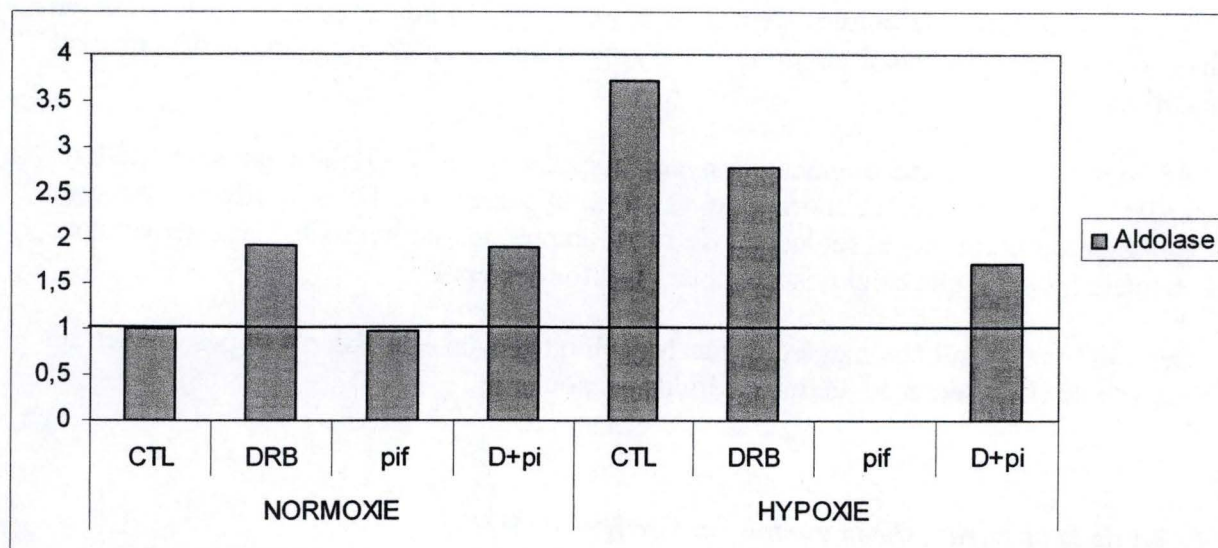


Fig.18: Mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 en suivant l'expression de l'ARN messenger de l'aldolase par real-time PCR. Les cellules HepG2 ont été incubées 16 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou en absence de DRB à 50 μ M (inhibiteur de la CK2) et/ou de pifithrine à 20 μ M (inhibiteur de p53). Ces cellules ont ensuite été lysées et l'ARN en a été extrait. L'ADNc rétro-transcrit a été amplifié par PCR en présence d'amorces spécifiques de l'aldolase et de Syber green. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité d'ARN messenger de la tubuline- α . Les résultats sont exprimés en niveau d'induction par rapport aux cellules contrôles en normoxie.

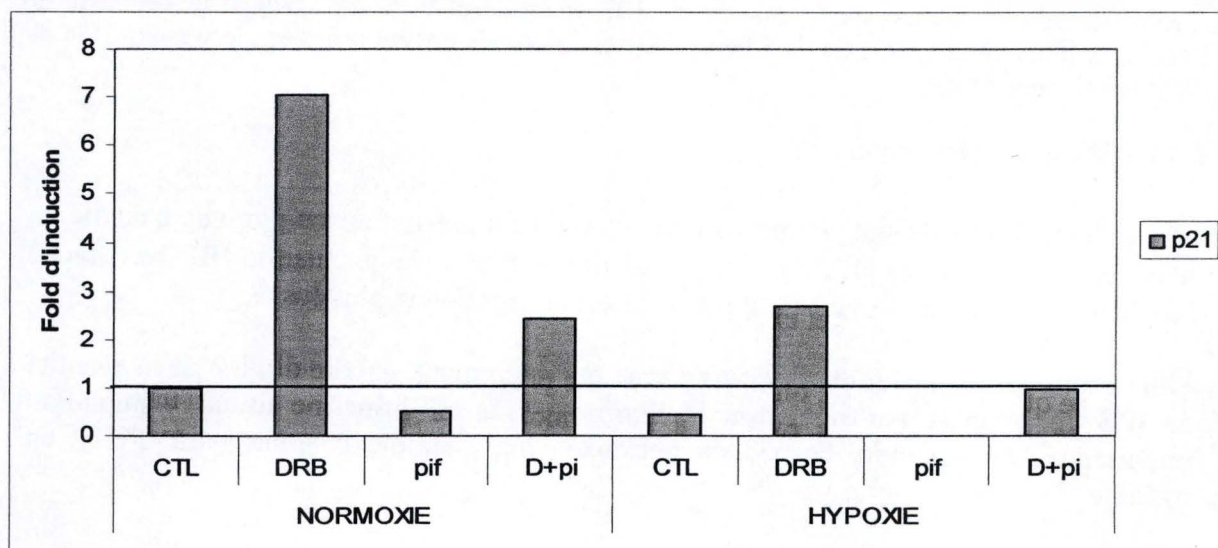


Fig.19: Mesure de l'activité transcriptionnelle de p53 en suivant l'expression de l'ARN messenger de p21 par real-time PCR. Les cellules HepG2 ont été incubées 16 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou en absence de DRB à 50 μ M (inhibiteur de la CK2) et/ou de pifithrine à 20 μ M (inhibiteur de p53). Ces cellules ont ensuite été lysées et l'ARN en a été extrait. L'ADNc rétro-transcrit a été amplifié par PCR en présence d'amorces spécifiques de p21 et de Syber green. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité d'ARN messenger de la tubuline- α . Les résultats sont exprimés en niveau d'induction par rapport aux cellules contrôles en normoxie.

2.3.2 Effets sur l'activité de HIF-1 et de p53

La pifithrine est également inhibiteur de la Firefly luciférase (Rocha *et al*, 2003). Il n'est donc pas possible de la tester dans un système rapporteur. Par contre, nous avons étudié son effet sur l'activité de HIF-1 et de p53 en suivant l'expression d'un de leurs gènes cibles en real-time PCR et en western Blot.

2.3.2.1 Effets de la pifithrine sur l'expression de l'aldolase (gène cible de HIF-1) (Figure 18)

L'expression de l'ARN messager de l'aldolase a été suivie par real-time PCR.

L'expression de l'aldolase est plus importante en hypoxie qu'en normoxie. Le DRB induit une augmentation de l'expression en normoxie et une diminution de l'expression en hypoxie. En normoxie, la pifithrine n'a pas d'effet et la condition DRB+pifithrine montre un effet proche de celui du DRB seul. L'ARN de la condition pifithrine n'a pas pu être analysé.

2.3.2.2 Effets de la pifithrine sur l'expression de p21 (gène cible de p53) (Figure 19)

La quantité d'ARN messager de p21 diminue de 50% en hypoxie, comme nous l'avons déjà observé à la figure 12.

Le DRB augmente l'expression de p21 de façon importante. La pifithrine a quant à elle un effet inhibiteur sur l'expression de p21. Lorsque du DRB et de la pifithrine sont ajoutés ensemble, on constate un effet inférieur à celui du DRB seul, mais supérieur à celui de la pifithrine seule. Ces résultats permettent de postuler un effet dominant de la pifithrine inhibant l'activité de p53, même si la protéine est présente en quantité plus importante.

2.3.2.3 Western blot (Figure 16)

Une autre estimation de l'activité de p53 a été réalisée en mesurant la quantité de p21 par western blot. La quantité de p21 est plus beaucoup plus importante en normoxie qu'en hypoxie. L'effet des inhibiteurs est quant à lui différent en normoxie et en hypoxie. En normoxie, on observe une diminution de la quantité de p21 en présence de pifithrine. En hypoxie, la quantité mesurée pour le contrôle est très basse et la pifithrine semble augmenter la quantité de p21, aussi bien à concentration de 20 μ M que de 10 μ M.

2.3.3 Conclusions

Nous avons observé que la pifithrine décrite comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53, diminue effectivement cette activité en normoxie. Cette activité a été mesurée par l'expression de p21, mais également la quantité de p53. Elle semble également diminuer la quantité de HIF-1 α en hypoxie et des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de définir son effet sur l'activité de HIF-1.

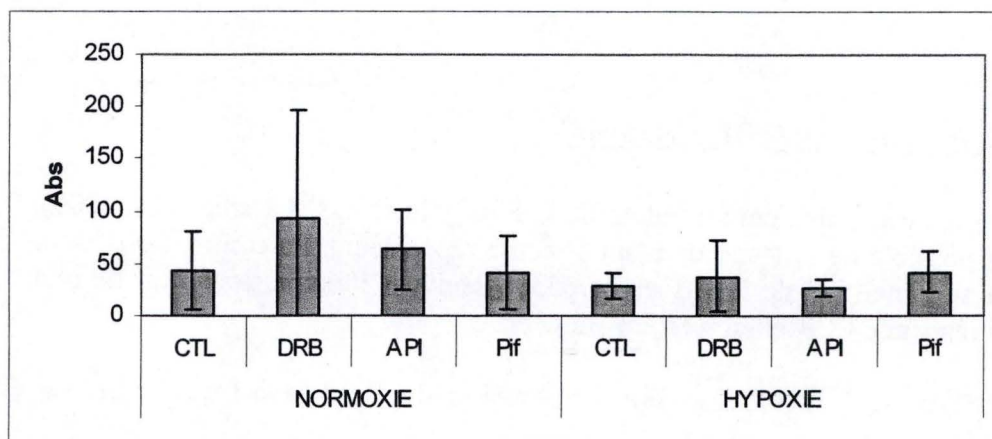


Fig.20: Effet de l'hypoxie et des inhibiteurs sur la liaison de HIF-1 à p53, lui-même fixé à sa séquence consensus. Un trans-AM a été réalisé sur des extraits nucléaires de cellules HeLa incubées 5 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou sans inhibiteurs de la CK2 (DRB à 50 μ M, Apigénine à 20 μ M) et avec ou sans pifithrine à 20 μ M (inhibiteur de p53). La révélation a été effectuée avec des anticorps primaires anti-HIF-1 α qui ont ensuite été marqués à l'aide d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase. Les résultats sont présentés en unités d'absorbance (X1000) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

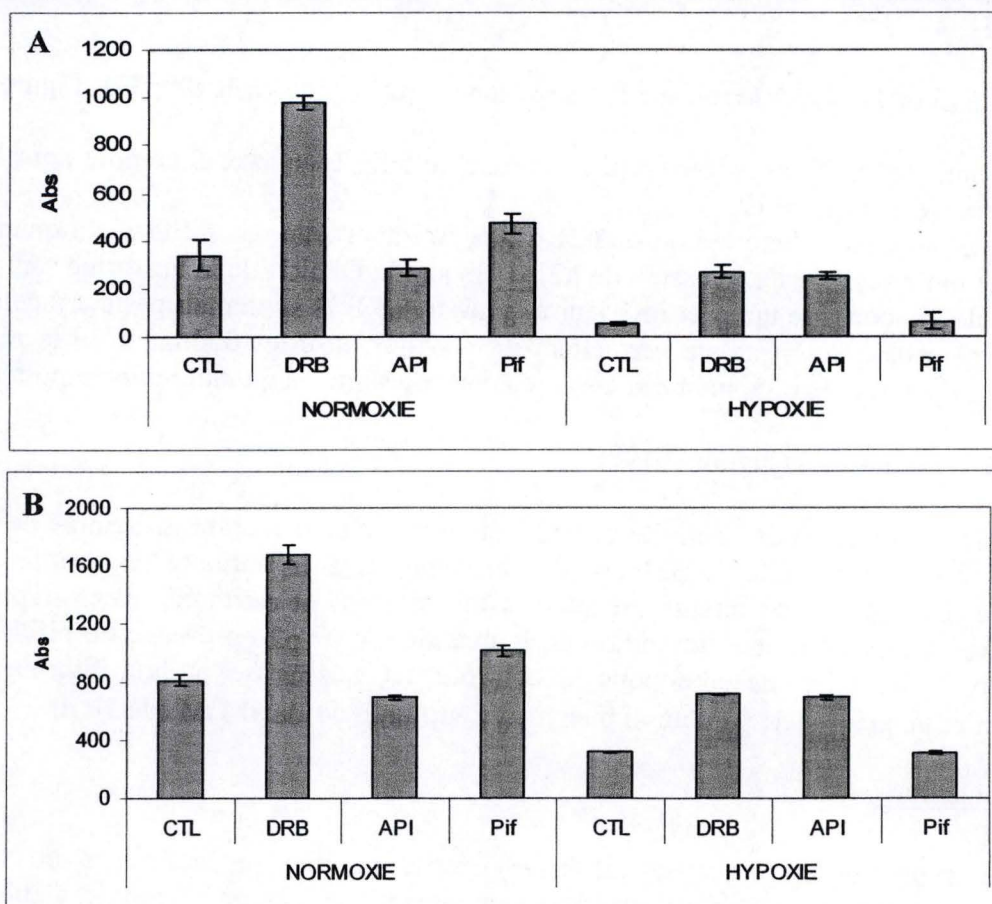


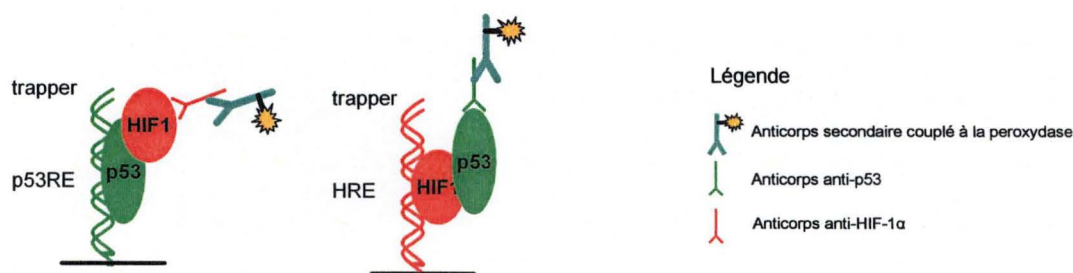
Fig.21: Effet de l'hypoxie et des inhibiteurs sur la liaison de p53 à HIF-1, lui-même fixé sur sa séquence consensus (A) et sur la liaison de p53 à sa propre séquence consensus (B). Un trans-AM a été réalisé sur des extraits nucléaires de cellules HeLa incubées 5 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou sans inhibiteurs de la CK2 (DRB à 50 μ M, Apigénine à 20 μ M) et avec ou sans pifithrine à 20 μ M (inhibiteur de p53). La révélation a été effectuée avec des anticorps primaires anti-HIF-1 α (5A) ou anti p53 (B) qui ont ensuite été marqués à l'aide d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase. Les résultats sont présentés en unités d'absorbance (X1000) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

2.4 Interaction directe entre HIF et p53

Les résultats précédents montrent que lorsque la quantité de p53 augmente, l'activité de HIF-1 diminue et vice-versa. Il s'agit d'une régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 puisque l'on observe ces effets sans influence importante sur la quantité de HIF-1 α . La question qui se pose dès lors est de savoir si il existe une interaction directe entre HIF-1 et p53. Pour mettre en évidence une éventuelle interaction directe entre HIF-1 et p53, nous avons utilisé deux approches.

2.4.1 Mise en évidence de l'interaction par trans-AM modifié

Un système trans-AM a tout d'abord été utilisé, avec des puits tapissés d'ADN trappeur contenant la séquence consensus spécifique de HIF-1 ou de p53. Après avoir déposé les lysats cellulaires dans ces puits, des marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps primaires spécifiques de l'un ou l'autre de ces facteurs et ce de façon croisée afin de détecter si HIF-1 se lie à p53 fixé à l'ADN et vice-versa. Le principe de cette expérience est illustré ci-dessous.



Différents protocoles d'extraction pour obtenir des extraits nucléaires ont été testés, notamment en diminuant la concentration en sels, afin de préserver les interactions protéines-protéines (Méthode 1 du point 8 du Matériel et Méthodes). Cependant, dans ces conditions, l'extraction de HIF-1 n'était pas satisfaisante. Nous sommes donc passés à la méthode 2, qui permet une bonne extraction de HIF-1 mais contient plus de sels.

2.4.1.1 HIF-1 sur sonde (trappeur) p53 (Figure 20)

Lorsqu'on essaie de détecter HIF-1 sur p53 lui-même lié à sa séquence consensus à l'aide d'anticorps spécifique de HIF-1 α , on n'obtient que des valeurs très faibles avec des écarts-types très importants, ce qui signifie qu'on ne détecte rien. Les conditions expérimentales de dosage des 2 facteurs de transcription diffèrent, notamment au niveau des tampons de binding (sels, pH, milieu réducteur : voir matériel et méthodes, tableau 10, point 9). Il est donc possible que ces conditions ne soient pas favorables à la conservation d'un HIF-1 fonctionnel. Il est également possible que les interactions protéine-protéine n'aient pas été conservées.

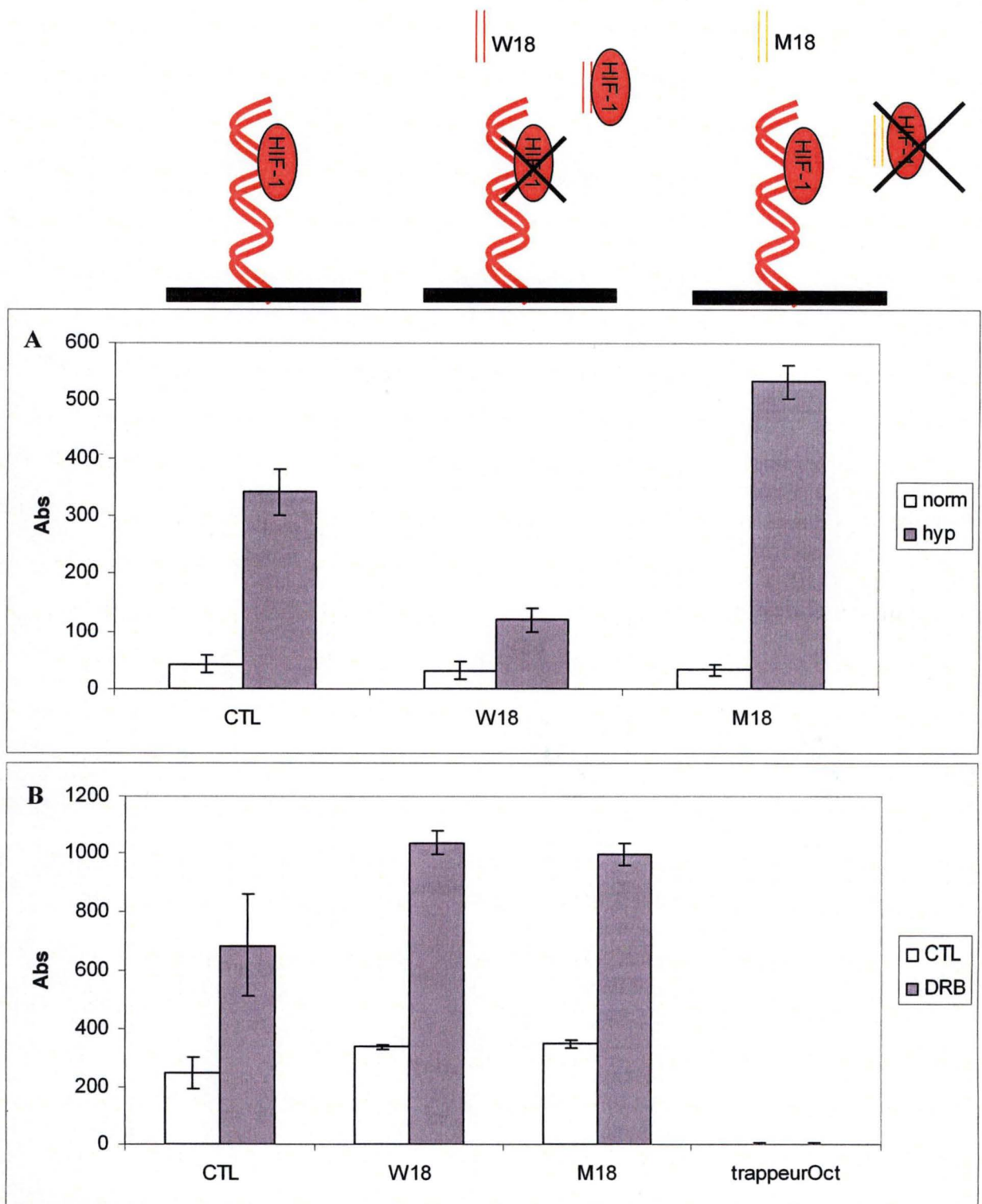


Fig.22: Compétition de la liaison de HIF-1 à sa séquence consensus (A) ou de la liaison de p53 au complexe de HIF-1-trappeur HIF-1 (B) à l'aide d'une sonde soluble contenant le site HRE sauvage (W18) ou muté (M18). Un trans-AM a été réalisé sur des cellules HeLa incubées 5 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence ou sans DRB à 50 μ M (inhibiteur de la CK2). La révélation a été effectuée avec des anticorps primaires anti-HIF-1 α ou anti-p53 qui ont ensuite été marqués à l'aide d'anticorps secondaires couplés à une peroxydase. Les résultats sont présentés en unités d'absorbance (X1000) en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

2.4.1.2 p53 sur sonde HIF-1 (Figure 21)

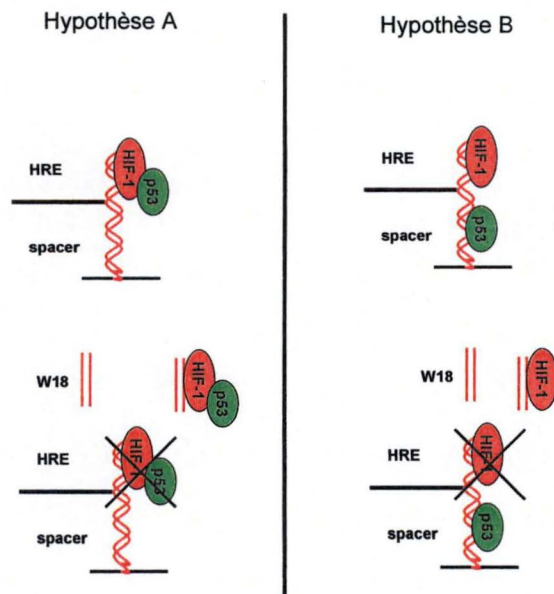
Un test trans-AM a été réalisé dans le but d'essayer de détecter p53 sur HIF-1, lui-même fixé à sa séquence consensus (figure 21 A). Les résultats obtenus montrent une très forte similitude avec les résultats obtenus avec les mêmes extraits nucléaires après un autre test trans-AM ayant pour objectif la détection de p53 lié à sa propre séquence consensus (figure 21 B). La forte ressemblance entre ces résultats suggère que p53 se fixe à l'ADN trappeur de HIF-1 de manière directement proportionnelle à sa quantité, ce qui voudrait dire que dans les conditions du dosage pour HIF-1, p53 se lie à l'ADN de manière non spécifique.

Ceci a déjà été mentionné dans la littérature qui parle d'un site non spécifique de liaison à l'ADN (Bakalkin *et al*, 1995). Une expérience a donc été effectuée afin de déterminer l'impact de ces liaisons non spécifiques.

2.4.1.3 Compétition avec sonde libre

Un système de compétition a été développé dans lequel la sonde W18, une sonde contenant un site HRE reconnu par HIF-1 et la sonde M18 une sonde contenant un site HRE muté qui ne peut pas être reconnu par HIF-1 ont été utilisées (Figure 22).

Dans le système trans-AM, la sonde trappeur contient un spacer d'environ 200 pb commun pour les différents tests et le site consensus spécifique de chaque facteur transcriptionnel dosé. Si la liaison de p53 observée à la figure 21 A est due à une interaction de p53 sur HIF-1, celle-ci devrait être déplacée si on ajoute dans le test une petite sonde libre contenant le site HRE (Hypothèse A). Par contre, si p53 est lié au spacer, de façon non spécifique, la présence d'une petite sonde contenant le site HRE ne devrait pas diminuer cette liaison (Hypothèse B).



Les résultats de la figure 22 A servent de contrôle afin de vérifier la validité du système de compétition. On observe successivement la liaison de HIF-1 au trappeur sans sonde

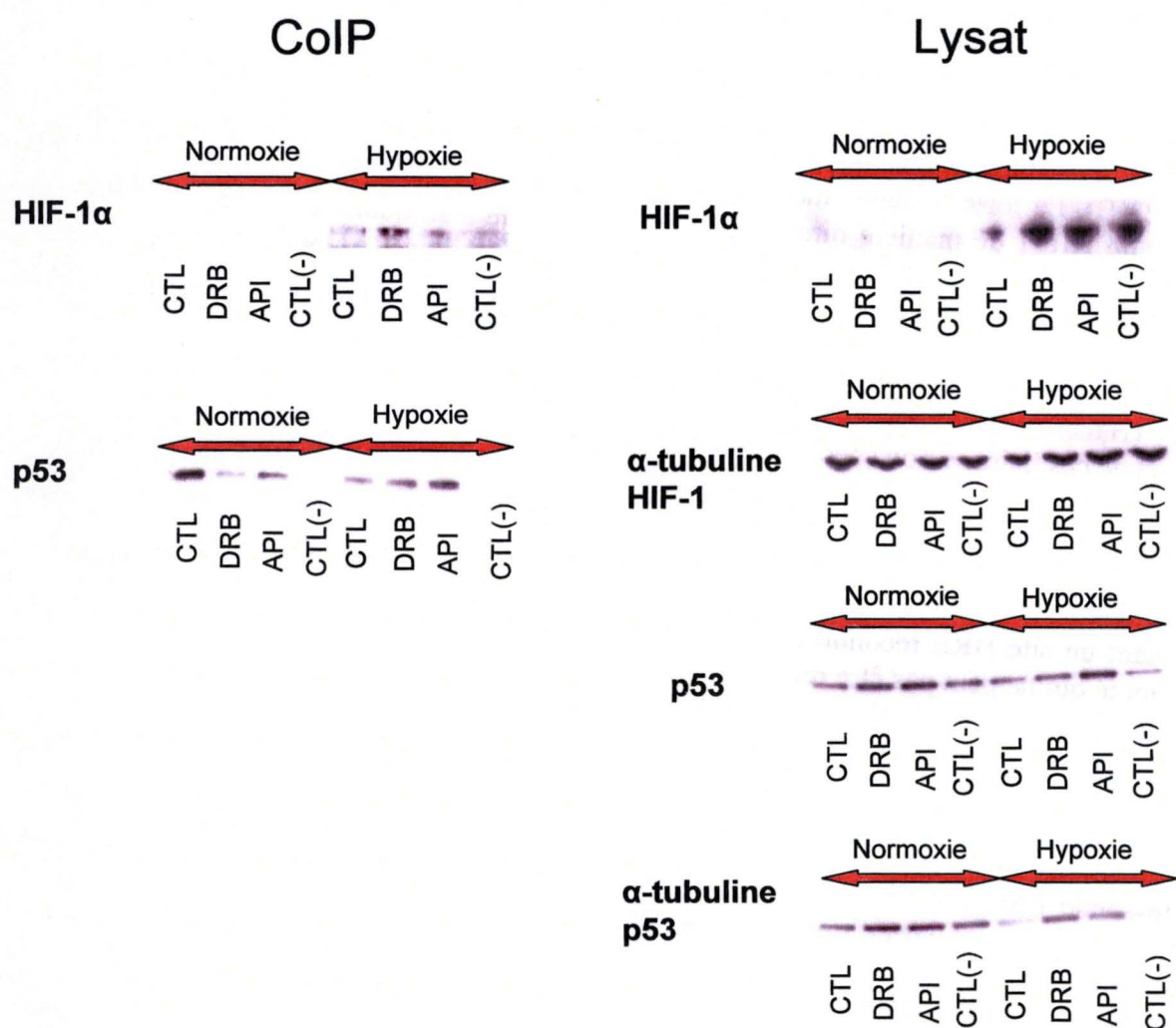


Fig.23: **Effet de l'hypoxie et des inhibiteurs sur l'interaction entre HIF-1α et p53.** Des cellules HepG2 ont été incubées durant 5 heures en hypoxie ou en normoxie, en présence d'inhibiteurs de la CK2 (DRB 50 μ M, Apigénine 20 μ M). Des lysats totaux ont ensuite été réalisés et une partie de ces lysats a été incubée avec des anticorps anti-p53 puis des billes de sépharose tapissées de protéines A et G. Des contrôles négatifs (CTL (-)) dans lesquels on n'a pas ajouté d'anticorps anti-p53 ont été réalisés. Les billes ont été portées à une température de 100°C, en présence de bleu de charge pour western-blot et centrifugées. Les surnageants récupérés et les lysats prélevés avant l'incubation en présence d'anticorps ont été mis à migrer en électrophorèse. Après transfert des protéines sur membrane, la révélation a été effectuée au moyen d'anticorps anti-HIF-1α ou anti-p53 par western blot. La quantité de protéines transférée a été estimée avec un anticorps anti- α -tubuline

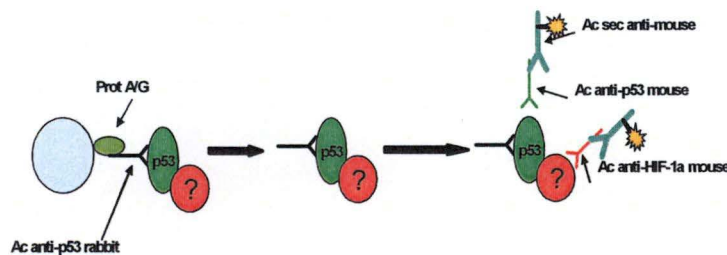
(CTL), la perte de la liaison de HIF-1 au trappeur lors de la présence d'une sonde sauvage (W18) et une liaison importante de HIF-1 au trappeur lorsque une sonde mutée a été ajoutée (M18). Ces résultats montrent que la sonde libre peut effectivement induire une compétition.

La figure 22B représente les résultats obtenus lors de la détection de p53 sur HIF-1 lui-même lié à son trappeur, et ce, en présence ou non de sonde. On ne voit pas de différence entre la situation de compétition avec la sonde sauvage, dans laquelle HIF-1 n'est plus lié, et la situation sans compétition. Cette observation permet de conclure que p53 se fixe bien de façon non spécifique au trappeur de HIF-1. Une fixation s'effectue au niveau du spacer car elle est levée lorsque l'on ajoute un trappeur complet sans site de liaison spécifique pour HIF-1 ou p53. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour mettre au point des conditions de dosage évitant la fixation non spécifique de p53 à l'ADN tout en conservant les interactions protéines-protéines.

2.4.2 Mise en évidence de l'interaction entre p53 et HIF-1 α par coimmunoprécipitation (Figure 23)

2.4.2.1 Introduction

Cette coimmunoprécipitation a pour but la mise en évidence d'interactions physiques entre HIF-1 α et p53. p53 est capturé par un anticorps anti-p53 de lapin, en espérant conserver les interactions avec les autres protéines, et le complexe formé est mis en présence de billes de Sépharose tapissées de protéines G et A qui se fixent spécifiquement au fragment Fc des anticorps. Les billes trappant le complexe sont lavées et ensuite chauffées à 100°C afin de décrocher p53 et ses partenaires potentiels. Une électrophorèse et une détection par western blot à l'aide d'anticorps primaires et secondaires sont alors réalisées pour mettre les partenaires en évidence. Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps anti-HIF-1 α et anti-p53 de souris, de façon à éliminer le bruit de fond qui résulterait de la mise en évidence par l'anticorps secondaire des anticorps primaires d'intérêt et des anticorps ayant servi à capturer p53. Un contrôle négatif a de plus été mis en place, de façon à distinguer la reconnaissance spécifique par les anticorps, de protéines trappées de manière non spécifique. Ce contrôle négatif a subi toutes les étapes de la CoIP, sauf l'ajout d'anticorps anti-p53 de lapin à la première étape.



Différentes mises au point ont été nécessaires afin de conserver l'interaction entre p53 et HIF-1. Tout au long de cette procédure, des essais différents ont été réalisés en changeant le tampon de lyse des cellules, par le fait de surexprimer ou non HIF-1 et la nature des

anticorps anti-p53 utilisés dans l'immunoprécipitation. Seuls les résultats décrits avec la nouvelle méthode sont décrits ici.

2.4.3 Interprétation des résultats

Au début de l'expérience, 50 µl de lysat total ont été prélevés, de façon à quantifier l'abondance de HIF-1α et de p53 dans les lysats cellulaires incubés dans les différentes conditions. On observe que HIF-1α est présent en hypoxie et que le DRB et l'apigénine n'affectent pas son abondance alors que p53 est présent en hypoxie dans une moindre quantité qu'en normoxie alors que les inhibiteurs augmentent son abondance dans les deux conditions.

Après coimmunoprécipitation, on peut observer la présence de HIF-1α en hypoxie, son absence chez le contrôle négatif (CTL(-)) atteste de son identité. Il y a donc bien interaction avec p53. Malgré le fait que la quantité de HIF-1α soit constante dans les différentes conditions, on observe plus de protéines HIF-1α coimmunoprécipitées avec p53 dans les cellules qui ont été incubées en présence de DRB ou d'apigénine en hypoxie, c'est-à-dire quand la protéine p53 est plus abondante.

La présence de p53 est elle aussi vérifiée par la présence de bandes de plus forte intensité en normoxie qu'en hypoxie et par son absence chez le contrôle négatif. Ces résultats supposent qu'il y a plus de HIF-1α associé à p53 quand il y a plus de protéines p53 présentes dans les cellules.

**Conclusions
et
Perspectives**

Conclusions et perspectives

HIF-1 est un facteur transcriptionnel qui a été identifié par Wang et Semenza (1994) comme étant spécifiquement impliqué dans la réponse adaptative des cellules à l'hypoxie. En hypoxie, la cellule développe des mécanismes compensatoires qui lui permettent de s'adapter aux nouvelles conditions d'oxygénation et de nutrition (glucose), en assurant sa survie. En hypoxie, la cellule réoriente son métabolisme énergétique vers la voie de la glycolyse, puisque l'oxygène nécessaire aux phosphorylations oxydatives comme accepteur final d'électrons est moins abondant en hypoxie qu'en normoxie. Dans les tumeurs, un des premiers problèmes posés à la survie des cellules tumorales est le manque en oxygène, qui survient lorsque la tumeur grossit et dépasse 1 mm³ de volume. Les cellules se retrouvent alors au delà de la limite de diffusion de l'oxygène, ce qui induit l'expression de HIF-1 α , son association à ARNT et la transcription de gènes susceptibles d'aider la cellule à supporter les nouvelles conditions environnementales. Les produits des gènes activés permettent notamment de favoriser l'oxygénation des tissus en induisant la néoangiogenèse (VEGF), ce qui permet l'apparition de nouvelles voies de ravitaillement en oxygène. Une autre fonction importante des gènes activés par HIF-1 est de maintenir la production d'ATP en exprimant les enzymes nécessaires aux différentes étapes de la glycolyse (Aldolase A, émolase, phosphoglycérate kinase-1). Malgré que le rôle crucial de HIF-1 dans l'établissement des tumeurs soit bien établi, la régulation de HIF-1 et les mécanismes intervenant dans cette régulation ne sont pas encore bien connus.

Les protéines p53 et CK2 jouent également un rôle car elles modulent la viabilité des cellules cancéreuses : dans ces cellules, p53 peut être muté et la CK2 surexprimée. Le rôle de ces deux protéines dans la régulation de HIF-1 est étudié au laboratoire dans des cellules en état d'hypoxie parce que ces conditions sont proches de celles régnant dans les tumeurs *in situ*.

Il a précédemment été montré que la CK2 inhibe p53 en conditions normales, en diminuant son temps de demi-vie. Par ailleurs, p53 est connu pour inhiber HIF-1, d'une part en ciblant HIF-1 α pour la dégradation par le protéasome, et d'autre part, en entrant en compétition avec HIF-1 pour la liaison à CBP/p300. Cependant, un rôle de la CK2 dans la régulation de HIF-1 n'a pas encore été démontré. Des résultats préliminaires obtenus par D. Mottet au Laboratoire ont montré qu'une inhibition de la CK2 conduit à une diminution de l'activité de HIF-1. Cependant, le mécanisme de cette régulation restait inconnu. Nous avons postulé une hypothèse de double inhibition : ce serait en inhibant p53 que la CK2 active HIF-1, si la CK2 est inhibée, p53 peut s'accumuler et induire une inhibition de HIF-1. L'objectif de ce mémoire était de vérifier cette hypothèse.

1. Première partie : Etude des effets du DRB et de l'apigénine sur HIF-1 et p53

La première partie de ce travail avait pour but d'établir des parallélismes entre les effets de deux inhibiteurs de la CK2 sur les quantités, les liaisons à l'ADN et les activités transcriptionnelles des facteurs de transcription HIF-1 et p53. En effet, il était important

d'examiner ces différents paramètres, car ce n'est pas parce qu'une protéine est abondante qu'elle est forcément active et toutes les protéines fixées à l'ADN n'ont pas obligatoirement une activité transcriptionnelle. C'est le cas notamment de AP-1 qui peut être sous trois formes : une forme liée à l'ADN et active, une forme liée et inactive et une troisième forme non-liée inactive.

Dans une première série d'expériences, nous avons inhibé la CK2 au moyen de deux inhibiteurs chimiques (DRB, Apigénine) et nous avons mesuré les quantités de HIF-1 et de p53 par western-blot et par immunofluorescence. Nous avons remarqué que l'hypoxie engendre une augmentation importante de la quantité de HIF-1 α et une diminution de la quantité de p53. Si l'hypoxie se prolonge (de 5 heures à 16 heures), la quantité de HIF-1 α diminue, tandis que celle de p53 est encore plus basse. Les inhibiteurs de la CK2 semblent provoquer une légère diminution de la quantité de HIF-1 α dans les cellules HepG2 et une légère augmentation dans les cellules HeLa. Par ailleurs, la quantité de p53 est toujours augmentée par les inhibiteurs, en normoxie comme en hypoxie, et ce, dans les deux lignées cellulaires.

Par la suite, nous avons mesuré la liaison à l'ADN de HIF-1 et de p53 par trans-AM. Un parallélisme est observé entre l'évolution des quantités de HIF-1 et de p53 et leur activité de liaison à l'ADN, non seulement pour ce qui est de l'effet de l'hypoxie, mais aussi en ce qui concerne l'effet des inhibiteurs.

Enfin, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et de p53 en suivant l'expression de gènes cibles, par real time PCR, ou par système rapporteur et western blot (p21 pour p53 et l'aldolase pour HIF-1). Les résultats montrent une faible expression de l'aldolase en normoxie et une expression qui augmente fortement en hypoxie. Les deux inhibiteurs de la CK2 provoquent peu d'effet en normoxie et une diminution nette de l'expression de l'aldolase en hypoxie. Des résultats similaires ont été obtenus en système rapporteur. Quant à p21, son expression augmente sous l'action du DRB, que ce soit en hypoxie ou en normoxie. Les inhibiteurs engendrent donc une augmentation de l'activité de p53 et une diminution de l'activité de HIF-1. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'établir un profil d'expression des différents gènes cibles de ces deux facteurs en utilisant des damiers à ADN.

En conclusion, les inhibiteurs de la CK2 augmentent la quantité et la liaison à l'ADN de la protéine p53 et ces observations sont à mettre en parallèle avec une augmentation de son activité. Pour ce qui est de HIF-1, en hypoxie, la quantité et la liaison à l'ADN varient peu, en présence des inhibiteurs de la CK2 tandis que son activité diminue fortement. L'hypothèse que nous proposons au vu de ces résultats est la suivante : lorsque les inhibiteurs lèvent l'inhibition exercée par la CK2 sur p53 en la ciblant pour la dégradation par le protéasome, p53 est alors stabilisé et inhibe HIF-1. Cette inhibition pourrait s'effectuer par compétition avec p300, qui est indispensable à HIF-1 pour l'exercice de son activité transcriptionnelle.

2. Deuxième partie : Etude des interactions entre HIF-1 et p53

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons essayé de mettre en évidence une interaction directe entre HIF-1 et p53. Afin de reproduire les effets de l'inhibition de la CK2, qui augmente la quantité de p53, nous avons augmenté ou diminué l'activité de p53 par différents moyens et étudié les effets de ces variations sur HIF-1. Dans un premier temps, nous avons surexprimé p53 et étudié les effets de cette augmentation sur l'activité de HIF-1

dans un système rapporteur. En hypoxie, la surexpression de p53 induit une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Nous avons ensuite mesuré l'activité de HIF-1 dans des cellules Hep3B déficientes pour p53. En effet, lorsque la CK2 est inhibée par le DRB ou l'apigénine, on observe une inhibition de HIF-1 par p53 dans des cultures où p53 est présent, alors que dans les cellules p53 (-/-), on ne devrait plus observer l'effet d'inhibition de HIF-1, puisque p53 est déficient. La mesure de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 par système rapporteur et en suivant l'expression de l'aldolase par real time PCR dans des cellules Hep3B, montre qu'il n'y a plus d'effet des inhibiteurs sur l'activité de HIF-1. Ces deux expériences nous permettent de suggérer que c'est bien via une augmentation de p53 que l'inhibition de la CK2 influence l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les cellules Hep3B, nous avons étudié les variations des quantités de HIF-1 α , de p53 et de p21 en présence d'un inhibiteur chimique de la p53, la pifithrine. Le mécanisme par lequel la pifithrine agit sur p53 demeure inconnu. La quantification de l'abondance de ces protéines a révélé que la pifithrine induit une diminution de la quantité de HIF-1 α en hypoxie. Il est important à ce stade d'envisager la possibilité d'une interaction de la pifithrine avec un autre acteur que p53, qui influencerait également HIF-1. Pour p53, une diminution de la quantité est induite par la pifithrine en normoxie, alors qu'il y a peu d'effet en hypoxie. Le peu d'effet observé en hypoxie vient peut-être du fait que p53 est présent en faible quantité en hypoxie, ce qui rend un effet éventuel de la pifithrine difficile à détecter. L'étude de l'effet de la pifithrine sur l'activité de HIF-1 sera complétée dans un avenir proche.

Les résultats précédents montrent que lorsque la quantité de p53 augmente, l'activité de HIF-1 diminue. Comme la quantité de HIF-1 α ne semble pas affectée de manière importante, une possibilité serait que p53 entre en compétition avec HIF-1 α pour p300. Une autre hypothèse non exclusive serait que p53 séquestre HIF-1 α de ARNT. Afin de mettre en évidence une interaction éventuelle entre ces deux facteurs transcriptionnels, deux approches ont été utilisées. Premièrement, un test trans-AM modifié afin de suivre la liaison de HIF-1 à p53, lui-même lié à sa séquence consensus et vice-versa a été employé. Cependant, il ne fut pas possible de détecter HIF-1 sur p53, vraisemblablement à cause de la difficulté de concilier les différences qui existent entre les conditions de dosage (sels, pH, milieu réducteur) de ces deux facteurs. La tentative de détecter p53 sur HIF-1 a mieux fonctionné, mais la ressemblance frappante de ces résultats avec ceux obtenus en mesurant p53 sur sa propre séquence consensus a fait soupçonner la présence d'un site de fixation non spécifique à l'ADN pour la protéine p53. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une compétition entre le trappeur comportant les boîtes HRE reconnues par HIF-1 et des petites sondes solubles, sauvages ou mutées dans la séquence consensus reconnue par HIF-1. Ces résultats montrent que p53 se lie effectivement à l'ADN de manière non spécifique, que HIF-1 y soit lié (condition M18) ou non (condition W18). Il serait intéressant de mettre au point un test trans-AM avec de nouveaux trappeurs sur lesquels p53 ne pourra pas se lier, et de développer un tampon de binding adéquat pour maintenir la spécificité de liaison de chacun des deux facteurs de transcription à son site consensus tout en maintenant les interactions protéine-protéine.

Une répercussion directe de changements de l'abondance de p53 sur l'activité de HIF-1 n'ayant pu être démontrée par trans-AM, une autre méthode a été employée pour mettre en évidence une éventuelle interaction entre HIF-1 et p53. Cette méthode est la coimmunoprécipitation.

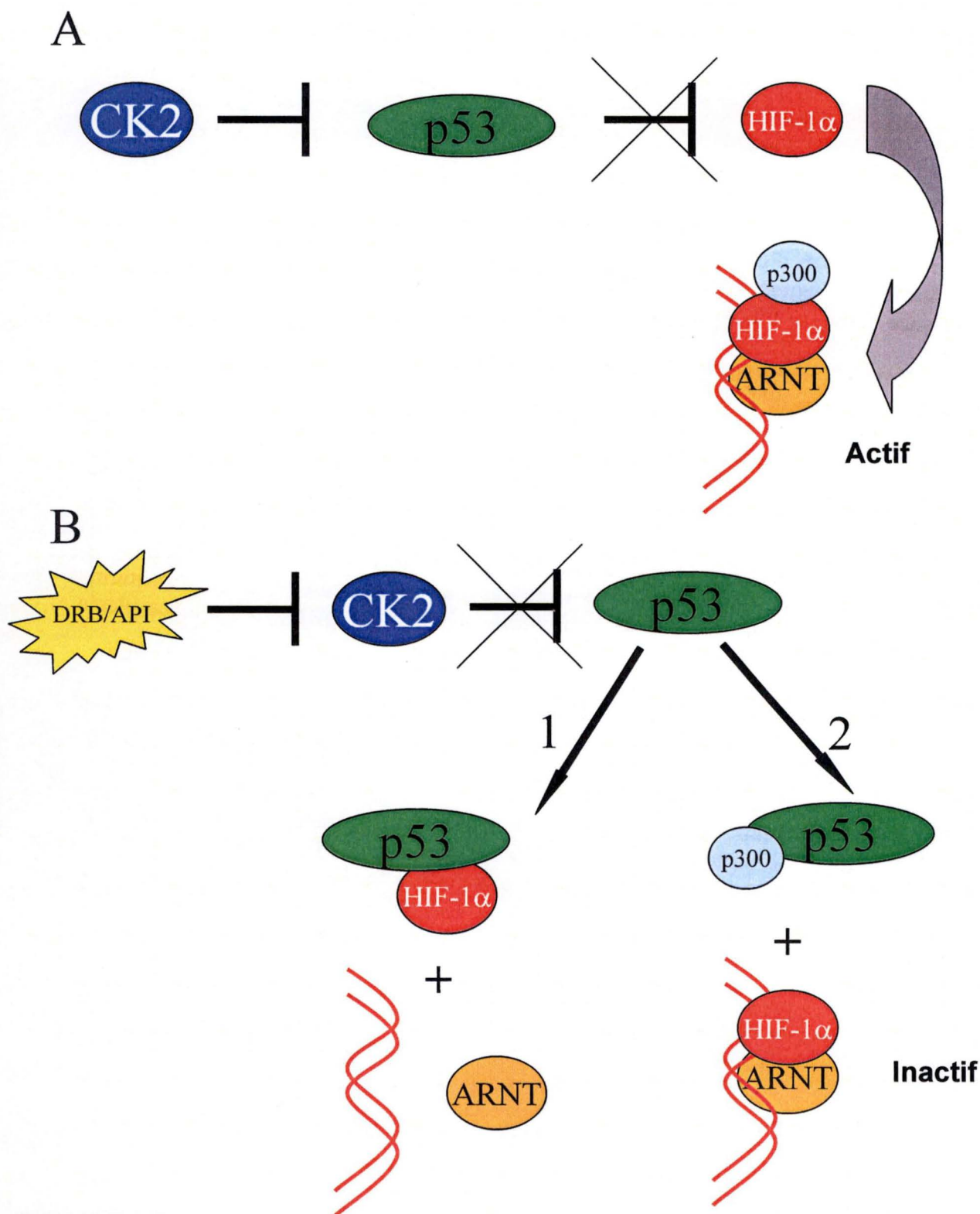


Fig.24: Hypothèse proposée pour expliquer le rôle de la CK2 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

- A. En hypoxie, lorsque la CK2 n'est pas inhibée, cette kinase exerce son inhibition sur p53 en diminuant sa stabilité, ce qui permet à HIF-1 α de se lier à ARNT et de former le facteur transcriptionnel HIF-1 actif.
- B. Lorsque la CK2 est inhibée, elle n'exerce plus d'inhibition sur p53 qui peut alors interagir avec HIF-1 α et inhiber HIF-1. Deux possibilités d'inhibition sont présentées ci-dessus: soit p53 se lie à HIF-1 α et l'empêche de se lier à ARNT et donc de former le facteur HIF-1 (1), soit p53 entre en compétition avec HIF-1 α pour p300, un co-activateur indispensable à l'activité de HIF-1 (2).

Après plusieurs essais de mise au point, une interaction entre HIF-1 α et p53 a été mise en évidence. Un contrôle négatif a été effectué en normoxie et en hypoxie, dans lequel toutes les étapes de l'expérience sont réalisées, excepté l'ajout de l'anticorps anti-p53 de lapin en début d'expérience. Ce contrôle nous a permis de distinguer la reconnaissance spécifique des protéines d'intérêt, des protéines trappées de manière non spécifique par les billes. Nous avons par ailleurs constaté que si p53 est plus abondant (lorsque la CK2 est inhibée), il y a plus de HIF-1 α récupéré. Ceci suggère une interaction entre les deux protéines avec séquestration de HIF-1 α par p53, et ceci d'autant plus qu'il y a plus de p53.

Cette interaction peut être directe ou indirecte. La caractérisation de cette interaction serait intéressante. Afin de déterminer si il y a une interaction directe entre les deux protéines, une coimmunoprécipitation réalisée sur les deux protéines transcrites et traduites *in vitro* pourrait être réalisée. Si une protéine intermédiaire est nécessaire, aucun résultat ne devrait être obtenu. Afin d'identifier cette éventuelle protéine intermédiaire, une expérience de coimmunoprécipitation sur lysat cellulaire suivie d'une séparation des protéines récupérées par gel 2D et identification par spectrométrie de masse pourrait être envisagée. Une protéine candidate est MDM2 qui a déjà été montrée comme interagissant avec HIF-1 α et p53 (Momand *et al*, 1992 ; Oliner *et al*, 1993 ; Haupt *et al*, 1996 ; Kubbuttat *et al*, 1998 ; Chen *et al*, 2003).

En conclusion, nous pouvons suggérer l'hypothèse suivante (voir figure 24): en hypoxie, lorsque les inhibiteurs de la CK2 sont absents, la CK2 exerce son activité d'inhibition sur p53 en diminuant sa stabilité. p53 n'a ainsi pas la possibilité d'inhiber HIF-1 α , qui peut alors se lier à ARNT, formant un facteur transcriptionnel HIF-1 actif. Lorsque la CK2 est inhibée, la quantité de p53 augmente, ce qui permet à p53 d'inhiber HIF-1. Cette inhibition peut s'exercer de deux manières : soit p53 entre en compétition avec HIF-1 α pour p300, soit p53 interagit avec HIF-1 α et l'empêche de se lier à ARNT. Ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs.

Bibliographie

Bibliographie

- Ahmed, K., Gerber, D. A. & Cochet, C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* **12**, 226-30 (2002).
- Allende, J. E. & Allende, C. C. Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *Faseb J* **9**, 313-23 (1995).
- Ashcroft, M., Taya, Y. & Vousden, K. H. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* **20**, 3224-33 (2000).
- Ashcroft, M. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-43 (1999).
- Bakalkin, G. et al. p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* **23**, 362-9 (1995).
- Banin, S. et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-7 (1998).
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* **12**, 461-8 (1993).
- Bilton, R. L. & Booker, G. W. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF α) regulation. *Eur J Biochem* **270**, 791-8 (2003).
- Birchenall-Roberts, M. C. et al. Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta 1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* **10**, 4978-83 (1990).
- Bouvet, M. et al. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* **58**, 2288-92 (1998).
- Bren, G. D., Pennington, K. N. & Paya, C. V. PKC-zeta-associated CK2 participates in the turnover of free I κ B α . *J Mol Biol* **297**, 1245-58 (2000).
- Buchou, T. & Cochet, C. [Protein kinase CK2: an enzyme that likes to be different]. *Med Sci (Paris)* **19**, 709-16 (2003).
- Buckbinder, L. et al. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**, 646-9 (1995).
- Buttgereit, F. & Brand, M. D. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* **312** (Pt 1), 163-7 (1995).
- Canman, C. E. et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**, 1677-9 (1998).
- Constantillos Koumenis, R. A., Ester Hammond, Patrick Sutphin, William Hoffman, Maureen Murphy, Jennifer Derr, Yoichi Taya, Scott T. Lowe, Michael Kastan, Amato, Giaccia. Regulation of p53 by Hypoxia: Dissociation of Transcriptional Repression and Apoptosis from p53-Dependant Transactivation. *Molecular and Cellular Biology* **21**, n°4, 1297-1310 (2001).
- Critchfield, J. W., Coligan, J. E., Folks, T. M. & Butera, S. T. Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6110-5 (1997).
- Dames, S. A., Martinez-Yamout, M., De Guzman, R. N., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Structural basis for Hif-1 α /CBP recognition in the cellular hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5271-6 (2002).

- Ebert, B. L. & Bunn, H. F. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol* **18**, 4089-96 (1998).
- Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y. & Kawajiri, K. A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem* **272**, 17640-7 (1997).
- Ema, M. et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J* **18**, 1905-14 (1999).
- Filhol, O., Martiel, J. L. & Cochet, C. Protein kinase CK2: a new view of an old molecular complex. *EMBO Rep* **5**, 351-5 (2004).
- Ford, H. L. et al. Cell cycle-regulated phosphorylation of the human SIX1 homeodomain protein. *J Biol Chem* **275**, 22245-54 (2000).
- Freedman, S. J. et al. Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5367-72 (2002).
- Gartel, A. L. & Tyner, A. L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-49 (2002).
- Gothi , P. HIF-1: régulateur central de l'hypoxie. *Medecine Sciences* **18**, 70-78 (2002).
- Grossman, S. R. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* **268**, 2773-8 (2001).
- Grossman, S. R. et al. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* **2**, 405-15 (1998).
- Guerra, B., Gotz, C., Wagner, P., Montenarh, M. & Issinger, O. G. The carboxy terminus of p53 mimics the polylysine effect of protein kinase CK2-catalyzed MDM2 phosphorylation. *Oncogene* **14**, 2683-8 (1997).
- Guerra, B., Issinger, O. G. & Wang, J. Y. Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* **22**, 4933-42 (2003).
- Guerra, B., Siemer, S., Boldyreff, B. & Issinger, O. G. Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2beta subunit fraction, devoid of the catalytic CK2alpha subunit, in mouse brain and testicles. *FEBS Lett* **462**, 353-7 (1999).
- Hanna, D. E., Rethinaswamy, A. & Glover, C. V. Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 25905-14 (1995).
- Haupt, Y., Barak, Y. & Oren, M. Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J* **15**, 1596-606 (1996).
- Helt, C. E., Rancourt, R. C., Staversky, R. J. & O'Reilly, M. A. p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity. *Toxicol Sci* **63**, 214-22 (2001).
- Hjerrild, M. et al. Phosphorylation of murine double minute clone 2 (MDM2) protein at serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells. *Biochem J* **355**, 347-56 (2001).
- Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-7 (1997).
- Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M. & Lee, F. S. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* **277**, 39792-800 (2002).

- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M. & Bunn, H. F. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* **271**, 32253-9 (1996).
- Ivan, M. et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-8 (2001).
- Jaakkola, P. et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-72 (2001).
- Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R. & Semenza, G. L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 17771-8 (1996).
- Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. & Poellinger, L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5667-72 (1997).
- Komarov PG, K. E., Kondratov EV, Chistov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV and Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733-1737 (1999).
- Kubbutat, M. H., Ludwig, R. L., Ashcroft, M. & Vousden, K. H. Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol* **18**, 5690-8 (1998).
- Lando, D. et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* **16**, 1466-71 (2002).
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H. & Kim, K. W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* **36**, 1-12 (2004).
- Leroy, D. et al. Direct identification of a polyamine binding domain on the regulatory subunit of the protein kinase casein kinase 2 by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* **270**, 17400-6 (1995).
- Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**, 1-15 (2003).
- Luo, Y., Hurwitz, J. & Massague, J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**, 159-61 (1995).
- Martel, V., Filhol, O., Nueda, A. & Cochet, C. Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation? *Ann N Y Acad Sci* **973**, 272-7 (2002).
- May, P. & May, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-36 (1999).
- Metzen, E. et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* **116**, 1319-26 (2003).
- Michiels, C. Physiological and Pathological Response to Hypoxia. (2004).
- Minet, E. et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* **468**, 53-8 (2000).
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-45 (1992).
- Mottet, D. et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* **278**, 31277-85 (2003).
- Mottet, D. et al. Role of ERK and calcium in the hypoxia-induced activation of HIF-1. *J Cell Physiol* **194**, 30-44 (2003).

- Niefind, K., Guerra, B., Ermakowa, I. & Issinger, O. G. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *Embo J* **20**, 5320-31 (2001).
- Okorokov, A. L. & Milner, J. An ATP/ADP-dependent molecular switch regulates the stability of p53-DNA complexes. *Mol Cell Biol* **19**, 7501-10 (1999).
- Oliner, J. D. et al. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857-60 (1993).
- Pinna, L. A. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci* **115**, 3873-8 (2002).
- Pinna, L. A. & Meggio, F. Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 77-97 (1997).
- Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* **64**, 889-92 (2002).
- Pollenz, R. S., Sattler, C. A. & Poland, A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* **45**, 428-38 (1994).
- Prowald, A., Schuster, N. & Montenarh, M. Regulation of the DNA binding of p53 by its interaction with protein kinase CK2. *FEBS Lett* **408**, 99-104 (1997).
- Pugh, C. W., Gleadle, J. & Maxwell, P. H. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia signalling pathways. *Breast Cancer Res* **3**, 313-7 (2001).
- Ravi, R. et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* **14**, 34-44 (2000).
- Rocha S, C. K., Roche KC, Perkins ND. The p53-inhibitor Pifithrin-alpha inhibits Firefly Luciferase activity in vivo and in vitro. *BioMedCentral Mol Bio.* **4**, 9 (2003).
- Ruas, J. L., Poellinger, L. & Pereira, T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem* **277**, 38723-30 (2002).
- Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* **272**, 22642-7 (1997).
- Sang, N., Fang, J., Srinivas, V., Leshchinsky, I. & Caro, J. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP. *Mol Cell Biol* **22**, 2984-92 (2002).
- Sang, N. et al. MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* **278**, 14013-9 (2003).
- Schuster, N. et al. Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J Cell Biochem* **81**, 172-83 (2001).
- Schuster, N. et al. Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J Cell Biochem* **81**, 172-83 (2001).
- Semenza, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* **64**, 993-8 (2002).
- Semenza, G. L. Physiology meets biophysics: visualizing the interaction of hypoxia-inducible factor 1 alpha with p300 and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11570-2 (2002).
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-32 (2003).

- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. & Iggo, R. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* **12**, 921-30 (1996).
- Shen J, C. P., Seldin DC, Sonenshein GE. Phosphorylation by the protein kinase CK2 promotes calpain-mediated degradation of IkappaBalpha. *Journal of Immunology*. **167**, 4919-25 (2001).
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. & Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325-34 (1997).
- Song DH, S. D., Seldin DC. Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *Journal of Biochemistry* **275**, 23790-7 (2000).
- Tawfic, S. et al. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopathol* **16**, 573-82 (2001).
- Tibbetts, R. S. et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**, 152-7 (1999).
- Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Semenza, G. L. & Van Obberghen, E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* **277**, 27975-81 (2002).
- Wang, G. L., Jiang, B. H. & Semenza, G. L. Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 669-75 (1995).
- Wang, G. L. & Semenza, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4304-8 (1993).
- White, F. A., Keller-Peck, C. R., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J. & Snider, W. D. Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. *J Neurosci* **18**, 1428-39 (1998).
- Wolf, D. A., Zhou, C. & Wee, S. The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol* **5**, 1029-33 (2003).
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-32 (1993).

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

16 JUIN 2004